



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

**REMODELACIÓN DE HIPERTROFIA CARDIACA POR**  
**INHIBICIÓN DEL GEN H-RAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:  
**JOSÉ MANUEL RAMOS KURI**

DIRECTOR DE TESIS:  
**Dr. Alejandro García Carrancá**  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas**

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, septiembre del 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

**José Manuel Ramos Kuri** es estudiante del **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas**, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y recibió la **beca No. 87843 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**.

Con especial agradecimiento al Dr. Alejandro García Carrancá, tutor de la presente tesis, por su apoyo incondicional a la realización de la misma.

## DEDICATORIA

A todos aquellos que me apoyaron durante esta larga peregrinación para realizar la tesis:

A mi mamá, Charlotte Kuri Majluf y a mi papá, Don Abel Ramos Cervantes (q.e.p.d.). Ejemplo a seguir en todos los sentidos. No sólo les debo la vida, sino también su apoyo incondicional a cada paso de mi vida, incluida la realización de la presente tesis.

A mi querida esposa Alma, quien me acompañó en la última etapa de este viaje. Gracias a su paciencia y trabajo no sólo he logrado crecer y madurar mucho en lo humano y lo profesional, sino que su colaboración fue clave para que este proyecto llegara a buen puerto.

A mis hermanos: Nacho, Lupe, Abel, Carlos, Luis, Paco, Memo, Felipe, Jesús, Tere, Ana Elena y Joaquín. Hemos convivido toda una vida, hemos superado retos y dificultades; nunca dejaron de alentarme para realizar este trabajo.

Al Dr. Juan Ramón Fabregat, a quien acompañé en la fundación de la Escuela de Medicina de la Universidad Panamericana; hombre inteligente, trabajador e íntegro, quien impulsó mi carrera como biólogo molecular.

A los Doctores Elie R. Chemaly, Larissa Lipskaia, Roger J. Hajjar y a los compañeros del Cardiovascular Research Center, primero en Harvard y luego en el Mount Sinai Hospital de Nueva York, donde realicé el presente trabajo, además de su atinada dirección, gocé siempre de su amistad, apoyo incondicional y tiempo para realizar los complejos ensayos con el gen Ras.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, donde realicé ensayos previos y me dieron todo el apoyo material y logístico en esa primera etapa del proyecto. En especial a Néstor Morales y su familia, todos investigadores: Irma y Néstor Jr. Su amistad y apoyo moral en todo este tiempo fueron invaluable.

Al Dr. Rodrigo Guerra y a todos mis buenos amigos del CISAV (Centro de Investigación Social Avanzada) de Querétaro. Por todo el apoyo para continuar mi trabajo de tesis; y donde intentamos construir el difícil puente entre las ciencias humanísticas y experimentales.

A mis compañeros de trabajo y amigos del Laboratorio de Biología Molecular de la UP: Salomón Hernández Gutiérrez, Fernando Hernández, Javier Estrada, Alfonso Reyes y Pablo Hernández Franco, con quienes realicé algunos ensayos previos a este trabajo, y que una injusta decisión política de las autoridades de esa universidad, dejó trunco un gran proyecto de investigación. Estoy en deuda con todos ellos.

A mis entrañables amigos: Jorge Espinosa, Enrique Siqueiros, Jorge Anaya, Manolo Díaz, Gerardo Espinosa y el Padre Francisco Cano. Con ellos y sus familias forjé mis años de juventud, y nos une una amistad a prueba del tiempo.

A todos mis alumnos, por su paciencia con mis errores y lo mucho que me han enseñado.

A Jesucristo: mi amigo incansable, sufriente, paciente, modelo a seguir, quien nunca me ha abandonado, ni en los momentos más difíciles y quien siempre ha sido bueno conmigo.

***No tengo palabras para agradecer a todos y cada uno de ustedes y a muchos otros que seguramente he dejado en el tintero... Por lo mucho que les debo, por lo que he logrado gracias a su constante apoyo: los llevo en mi corazón y en mis oraciones.***

***Manuel Ramos Kuri***

## ÍNDICE

Agradecimientos .....	II
Dedicatoria .....	III
Índice .....	IV

### RESUMEN

Español .....	1
Inglés .....	3

### INTRODUCCIÓN

1. Planteamiento del problema.....	5
2. Hipertrofia e Insuficiencia cardiaca.....	6
2.1. Hipertrofia cardiaca.	
2.2. Insuficiencia Cardiaca.	
2.3. Principales tipos de cardiomiopatía hipertrófica	
2.4. Bases fisiológicas de la contracción de miocardiocitos	
3. Vías de señalización en cardiocito.....	11
3.1. Introducción a las vías de señalización	
3.2. Vías de señalización en cardiomiocito	
3.3. Activadores hormonales de las vías en cardiomiocito	
3.4. Ras como parte de las vías de señalización	
3.5. Papel de -Ras en la respuesta hipertrófica	
3.6. Efecto de Ras-Val12 en corazón in vivo	
3.7. Factores de transcripción activados por Ras.	
3.8. Neurofibromina 1 (NF1), regulador de Ras	
4. Vía de señalización de Ras.....	21
4.1. Raf	
4.2. Cinasa activada por mitógenos (MAPK)	
4.3. Las otras dos vías de cinasas activadas por estrés: SAPK y p38	
4.4. Vía de hipertrofia patológica por calcineurina	
4.5. Interacción entre las vías	
4.6. Vías de señalización en hipertrofia patológica e insuficiencia cardiaca.	
5. Avances en terapia génica cardiaca .....	25

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo de cardiocitos como modelo para el estudio de oncogenes .....	28
2. Cirugía para transferencia de genes por adenovirus .....	28
3. Transferencia cardiaca de genes .....	29
4. Bando aórtico .....	30
5. Ecocardiografía .....	31
6. Efecto de la variante silvestre de Ras .....	32
7. RT-PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativo .....	33
8. Análisis del tamaño de cardiocitos por aglutinina de germen de trigo .....	34

## RESULTADOS

1. Resumen del artículo publicado .....	36
2. DN-Ras incrementa la expresión de SERCA2a .....	37
3. Remodelación de hipertrofia por la variante silvestre de Ras .....	37
3.1 Ras-WT causa sobre-hipertrofia .....	38
3.2. Grosor de pared ventricular .....	39
3.3. Diámetro interno de Ventrículo izquierdo con WT-Ras .....	39
3.4. Modificaciones fisiológicas del corazón con WT-Ras .....	40
3.5. Análisis histológico: tamaño de cardiomiocitos .....	41
3.6. Marcadores de hipertrofia, en corazón con AoB + WT-Ras .....	41
4. Consideraciones sobre el modelo .....	41

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

1. La sobre-hipertrofia cardíaca por la variante silvestre de H-Ras .....	44
2. Posible efecto remodelador de la DN-Ras en insuficiencia cardíaca .....	46
3. Ras y vías de señales: Observaciones paradójicas y contradictorias .....	47
4. Vía alterna de fenilefrina .....	50
5. Sobre el nombre oncogén .....	52
6. Ruta de trabajo para continuar la investigar de H-Ras en corazón .....	53

<b>REFERENCIAS</b> .....	56
--------------------------	----

## ANEXOS

Anexo I. Copia del artículo publicado (pags. 2870-2884 del Journal.....	60
Anexo II. Copia del <i>addendum</i> con créditos al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y al CONACYT en la revista	

## RESUMEN

### Título: REMODELACIÓN DE HIPERTROFIA CARDIACA POR INHIBICIÓN DEL GEN H-RAS

**Antecedentes.** A pesar de que desde hace más de dos décadas se conoce el papel central del gen H-Ras en enfermedades cardiovasculares, y que su inhibición puede bloquear el proceso de hipertrofia cardíaca, el presente es el primer trabajo a nivel mundial, que prueba su inhibición en un modelo de hipertrofia *in vivo*. La cardiomiopatía hipertrófica (CH) es un estadio previo a la insuficiencia cardíaca, y es una de las principales causas de mortandad a nivel mundial: Hipertensión arterial, infarto cardíaco, varias enfermedades genéticas, etc. pueden causar CH. Por su parte, el papel central del gen H-Ras en la regulación celular del cardiocito se conoce desde los años noventa. La mutación del gen H-Ras-Val12 activa su función, causando cáncer en muchos tejidos, pero en corazón causa hipertrofia. También se sabía que la inhibición del gen Ras con una mutante dominante negativa inhibe hipertrofia en cardiomiocitos *in vitro*, pero la presente tesis es el primer trabajo, que investiga el efecto anti-hipertrofiante en un modelo *in vivo*.

**Objetivo.** Esta tesis resume el trabajo previamente comentado y además: a) hace una revisión de la función de Ras y sus vías de transducción de señales en cardiomiocito, b) muestra resultados preliminares al sobre-expresar la variante normal de Ras en el modelo de sobrecarga ventricular, y c) discute otros aspectos del efecto de la DN-Ras, en especial un posible beneficio sobre insuficiencia cardíaca.

**Metodología.** Se moduló la función de H-Ras en modelos *in vitro* e *in vivo* de hipertrofia cardíaca en roedores. Esto se logró mediante la transferencia de diversas mutantes del gen H-Ras transferidas por medio de un vector adenoviral: la dominante negativa H-Ras-N17, la variante silvestre (Wild Type, H-Ras-WT), y la mutante oncogénica H-Ras-Val12. Estas variantes se probaron en el modelo *in vitro* de células miocárdicas de rata neonatal (NRCM) y en un modelo de sobrecarga ventricular (SV) por medio de un bandejo aórtico (BA). Dos semanas después los corazones se analizaron por ecocardiografía, y métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-PCR) a fin de estudiar los marcadores moleculares expresados en la sobrecarga y su modificación por las variantes del gen Ras.

**Resultados.** Los principales resultados de esta tesis se publicaron en:

Ramos-Kuri M, Rapti K, Mehel H, Zhang S, Perundurairi SD, Liang L, García-Carrancá A, Bobe R, Fischmeister R, Adnot S, Lebeche D, Hajjar RJ, Lipskaia L and Chemaly ER. 2015. **Dominant negative Ras (DN-Ras) attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy.** *Bioch. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.* 1853: 2870-2884.

Ese artículo demuestra que la inhibición de Ras *in vitro* tuvo efecto anti-hipertrofico en NRCM: inhibiendo NFAT y produciendo un efecto cardio-protector que se mostraba por mantener sus sarcómeros así como el latido de los cardiomiocitos. En el modelo de SV no inhibe hipertrofia pero, más importante aún, modificó la hipertrofia de tipo patológica a una fisiológica, con un buen potencial de aplicación terapéutica. Los ensayos *In vivo* demostraron que en el modelo de SV, la DN de Ras no bloqueó la hipertrofia, pero aumentó la fracción de eyección, comparado con el control y la Ras-Val12. Además, la DN-Ras redujo el área de los cardiomiocitos *in vivo*, y disminuyó la expresión de marcadores de hipertrofia cardíaca

patológica. Experimentos en cardiomiocitos adultos después de dos semanas de SV y transferencia del gen, la DN-Ras mejoró el acortamiento de sarcómeros y las medidas de calcio transitorio.

**Resultados complementarios.** En la presente tesis probamos la WT-Ras en el mismo modelo de SV. Aunque los resultados aún no son del todo conclusivos, dan una buena idea de los efectos de la variante silvestre de Ras en corazón. La transferencia de Ras-WT acentuó mucho la hipertrofia cardiaca, que nosotros describimos como sobre-hipertrofia (también referida como hipertrofia impropia). Su análisis molecular también sugiere una hipertrofia patológica, similar a las producidas por Ras Val12. Pero a la vez, Ras-WT produjo dos modificaciones que sugieren mejora fisiológica: engrosamiento de pared ventricular y el volumen en diástole y sístole no es mucho mayor que los controles positivos, que en un corazón tan grande, nos habla de una hipertrofia con buena contractilidad cardiaca. También presentamos dos evidencias que sugieren que la DN-Ras puede modular insuficiencia cardiaca: incrementa la expresión de SERCA2a, y disminuye fosforilación de ERK.

Aún se requieren ensayos adicionales a fin de confirmar estos resultados, y alcanzar datos más conclusivos con la prueba cardiaca de presión-volumen (P-V-Loop) a fin de identificar el tipo específico de remodelación cardiaca que Ras-WT produce.

**Conclusiones.** El presente es el primer trabajo a nivel mundial, que prueba la inhibición de H-Ras en un modelo *in vivo* de hipertrofia cardiaca. Los resultados son muy alentadores: Aunque la DN-Ras no inhibió la hipertrofia, la modula cambiando de patológica a fisiológica, con buen potencial de aplicación terapéutica. La remodelación lograda por las variantes de H-Ras, muestran el papel central de H-Ras en la modulación de la respuesta fisiológica/patológica en HC. Finalmente la remodelación benéfica de la DN-Ras en hipertrofia y su potencial beneficio en insuficiencia, muestra a Ras como un blanco interesante en terapia génica cardiaca.



## SUMMARY

### MODULATION OF CARDIAC HIPERTROPHY BY INHIBITION OF THE H-RAS GEN

**Background.** Although for more than twenty years, the central role of Ras gene in cardiovascular diseases is well known, and that its inhibition can block the heart hypertrophy process, the present is the first work worldwide that tried its inhibition in a model of in vivo hypertrophy. Hypertrophic cardiomyopathy (HC) is a disease and is a previous stage to cardiac failure, and it is one of the main causes of death worldwide. Several diseases like arterial hypertension, myocardial ischemia, several genetics diseases, etc., lead to HC. Etiam, the central role of the H-Ras gene in cellular regulation is known since the 1980s. Mutation of H-Ras in the 12<sup>th</sup> aminoacid, Val12 activates Ras function, causing onco-genesis in many tissues, but in heart where it causes hypertrophy. It was also known that inhibition of Ras gene inhibits cardiac myocyte hypertrophy In vitro. The present thesis is the first work that analyzes the possible anti-hypertrophic potential of Ras modulation in an in vivo model. The main results of the thesis are published on:

Ramos-Kuri M, Rapti K, Mehel H, Zhang S, Perundurair SD, Liang L, García-Carrancá A, Bobe R, Fischmeister R, Adnot S, Lebeche D, Hajjar RJ, Lipskaia L and Chemaly ER. 2015. Dominant negative Ras (DN-Ras) attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy. *BBA-Molecular Cell Research (Bioch Biophys Acta)*. 1853: 2870-2884.

**Objective.** This thesis basically continues the work of the paper previously commented, and: a) makes a comprehensive review of the role of Ras in heart, b) discuss the possible effect of DN-Ras on heart failure, and c) it shows preliminary results on the transfer of Ras Wild Type, (H-Ras-WT) on the same model of pressure overload, which can be the base for another paper on the issue.

**Methods.** Modulation of H-Ras gene was assessed in an in vitro model of cardiomyocyte hypertrophy in rat (NRCM), and an in vivo model of pressure overload (POH) in rat. Modulation of Ras gene was achieved by the addition of some mutants of H-Ras with an Adenoviral vector: the dominant negative H-Ras-N17 (DN-Ras), the Ras-Val12 oncogenic variant and the wild type H-Ras (WT-Ras). Finally, the hearts were analyzed by eco-cardiography and some molecular methods like the RT-PCR, (Quantitative Reverse Transcriptase PCR), in order to study molecular markers expressed on cardiac hypertrophy alone or with the modifications when the Ras gene variations were transferred.

**Results in the paper.** The paper base of the thesis shows that DN-Ras was antihypertrophic on NRCM: inhibits NFAT gene and exerted cardio-protective effects attested by preserved NRCM beating and sarcomeric structure. In vivo, with the POH model, DN-Ras was associated with similar hypertrophy two weeks after simultaneous induction of POH and Ras-mutant gene transfer. Moreover, DN-Ras reduced the cross-sectional area of cardiomyocytes, and decreased the expression of markers of pathologic cardiac hypertrophy. In isolated adult cardiomyocytes after 2 weeks of POH and Ras-mutant gene transfer, DN-Ras improved sarcomere shortening and calcium transients. Besides, LV diameters were shorter and LV fractional shortening bigger in the DN-Ras group compared to control and Ras-Val12.

In the thesis, we complement the previous work with some experimental advances with WT-Ras; although they are not conclusive yet, they give us a good overview of the function of the wild variant of H-Ras in heart. Over-expression of WT-Ras, in the same POH model of heart, showed that it causes a significant bigger hypertrophy against control hearts with only POH; the size of WT-Ras hearts is so big that we named it as over-hypertrophy (also referred as improper hypertrophy). At molecular level it showed

changes as pathologic hypertrophy, and also similar to Ras-Val12. However, Ras-WT generated two modifications that can be interpreted as a beneficial effect for heart: thickening of left ventricle wall, and the fact that systolic and diastolic ventricular volume did not change very much from the positive controls, in a such big hearts, this tell us of a hypertrophy but with good contraction. We also present a couple of evidences suggesting that DN-Ras inhibits heart failure: it increased SERCA2a expression, and down regulated ERK. We still need several extra experiments in order to confirm this over-hypertrophy, and obtain more conclusive data with the pressure-volume (P-V-loop) test in order to identify the specific kind of heart remodeling caused.

**Conclusions.** The present is the first worldwide work that inhibits H-Ras gene in hypertrophy in an in vivo model. Although DN-Ras did not inhibit hypertrophy, it changed it from pathologic to a physiologic kind, with a potential of therapeutic application. The heart remodeling reached by Ras variants in heart hypertrophy, shows the central role of Ras in modulation of cardiac function. Finally the beneficial remodeling of DN-Ras give us arguments to study the modulation of heart failure by Ras, suggesting an interesting target for gene therapy in heart.

## INTRODUCCIÓN

### 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El papel central del gen H-Ras en la regulación celular del cardiocito se conoce desde los años noventa. Desde entonces se sabe también que la mutación del gen H-Ras-Val12 activa su función, y que su hiperactividad causa cáncer en muchos tejidos, pero en corazón lleva a hipertrofia.

También se sabía que la inhibición del gen H-Ras con una mutante dominante negativa inhibe hipertrofia en cardiomiocitos *in vitro*, pero la presente tesis, junto con su artículo base, son el primer trabajo que investiga el efecto anti-hipertrofiante en un modelo *in vivo*.

Finalmente, la hipertrofia es un estadio previo a la insuficiencia cardíaca, la cual es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial: muchas y muy variadas enfermedades pueden causar esta hipertrofia: Hipertensión arterial, infarto cardíaco, algunas enfermedades genéticas, etc.

Dado que el artículo base de la tesis comienza con un claro planteamiento del problema, y contiene información central al problema, hacemos a continuación una traducción literal de la misma.

#### Traducción de la introducción del artículo base.

*“El grupo de proteínas de GTPasas pequeñas, son una súper-familia de proteínas que actúan como interruptores entre las señales extracelulares y las vías de señalización molecular (Jeyaraj 2011, Lezoualc'h 2008). La subfamilia Ras es la más importante de las GTPasas e incluye tres principales variantes homólogas: H-Ras, K-Ras y N-Ras. Los tres genes se expresan de manera ubicua con algunas variaciones en el patrón de expresión y función en tejidos en desarrollo o adulto. (Koera 1997, Esteban 2001).*

*“La hipertactividad de H-Ras en el cardiomiocito está asociada con su hipertrofia (Lezoualc'h 2008, Clerck 2000). Varios datos clínicos y experimentales así lo demuestran: i) en el síndrome de Costello, los pacientes con mutación activa de Ras desarrollan cardiomiopatía hipertrófica con taquicardia atrial (Schulz 2008). ii) Ratones transgénicos expresando la mutante activa Ras-Val12, muestran una hipertrofia ventricular similar a la cardiomiopatía hipertrófica humana (Gottshall 1997), y iii) estos mismos ratones muestran características patológicas de hipertrofia cardíaca (Wei 2011). La hipertrofia en los NRCM tratados con Ras-Val12 altera la estructura de la miofibrilla y daña el tránsito de calcio según se ha demostrado (Ho 1998).*

*“Por otro lado, se ha demostrado principalmente *in vitro* que la deficiencia de Ras o las mutantes dominantes negativas de Ras se asocian con efectos anti-hipertrofiantes: i) Ratones knock out K-Ras mueren en el día 15.5 de desarrollo embrionario, con paredes ventriculares cardíacas muy delgadas, que todo hace pensar que es la causa de muerte embrionaria (Koera 1997). ii) Thorburn por su parte (Thorburn 1993) demostró que Ras-Ala15 (una mutante inhibidora de Ras) bloquea la hipertrofia de NRCM activada por fenilefrina (PE). Fuller y sus colaboradores demostraron que la DN-Ras- N17 (DN-Ras) inhibe el efecto hipertrófico de la mutante activa de Src-Phe527 (Fuller 1998). iii) en 1997, Pracyck demostró el efecto anti-hipertrofiante de la DN-Ras en cardiomiocitos neonatales en condiciones basales, pero no bajo la estimulación por endotelina. iv) Recientemente, Nagalingam (2013) demostró que el efecto anti-hipertrofiante de miR-378 un MicroRNA que regula negativamente la señal de Ras en hipertrofia cardíaca.*

*“Pero el estudio de los efectos de Ras en hipertrofia cardíaca se dificulta por su regulación compleja y poco comprendida entre proteínas de la vía de señalización de Ras; además hay varios ejemplos de respuesta paradójica de los estímulos dependientes de Ras*

como por ejemplo, las respuestas divergentes entre Ras y Rap (Jeyaraj 2011, Zhang 2010). La mutante dominante negativa de Ras ejerce diferentes acciones en situación basal o bajo la estimulación de un ligando (Pracyck 1997). Duquesnes (2009) demostró que la vía de señalización ERK es inhibida por la DN-Ras en condiciones basales pero no bajo estimulación mecánica. También Harris (2004) demostró acciones aparentemente paradójicas de la cascada Raf-1-MAP cinasa. En ratones transgénicos con Ras-Val12 Ras los ventrículos muestran un fenotipo variable y heterogéneo (Clerk 2000, Gottshall 1997, Hunter 1995).

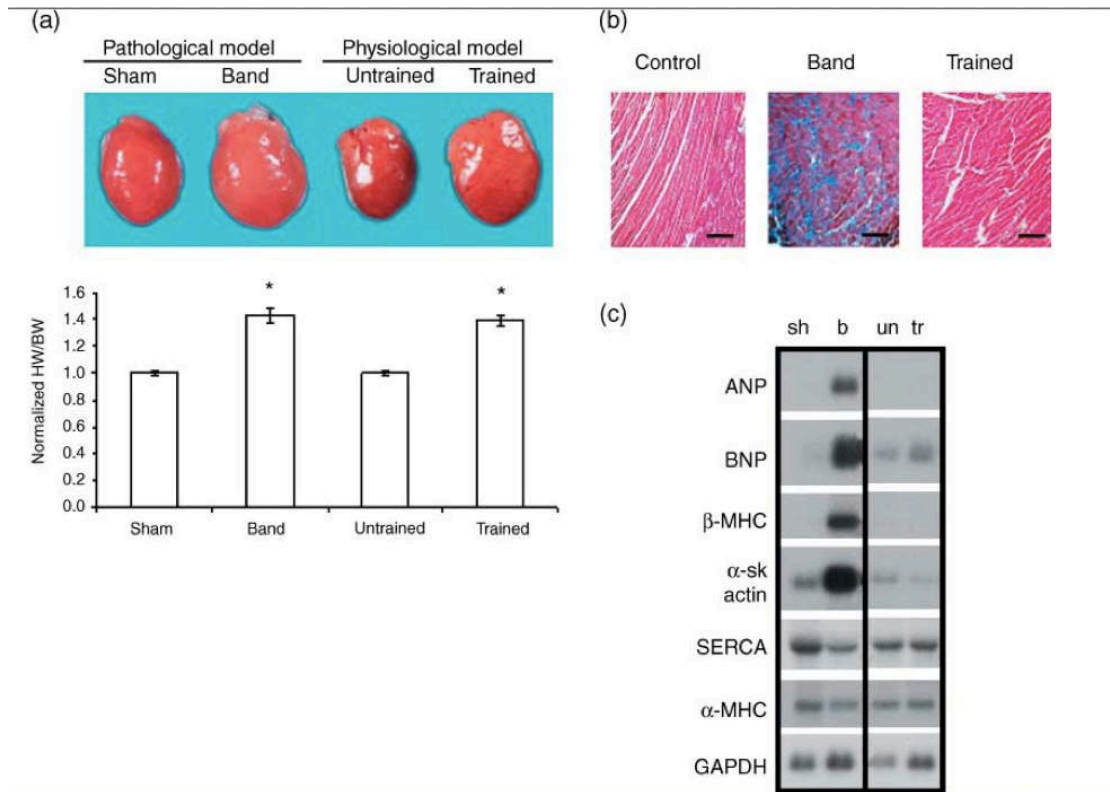
*“En el presente estudio, partimos de la hipótesis de que la mutante dominante negativa de Ras N17 podría ejercer un efecto anti-hipertrófico in vivo, pero encontramos más bien una acción agonista-antagonista en las vías Ras que llevan a efectos pro- o anti-hipertrófico, y el balance entre los efectos agonistas y antagonistas de la DN-Ras fue dependiente del estímulo. Y más allá de la respuesta hipertrófica investigamos el impacto de la DN-Ras y la mutante activa de Ras-Val12 en el carácter patológico de la hipertrofia por cardiomiocito. Con ese fin, realizamos estudios in vitro con y sin ligandos pro-hipertróficos e in vivo realizamos ensayos en la hipertrofia Ras de ventrículo izquierdo por el modelo de sobrecarga por presión (POH). A fin de corroborar los resultados obtenidos por las mutantes de Ras dominante negativa y la activa, se realizó un grupo de experimentos utilizando el sistema de silenciamiento de Ras por medio del método siRNA-H-Ras en NRCM”.*

En el texto de esta tesis presentamos además, algunos ensayos con la variante normal del gen Ras, (H-Ras-WT). Hasta donde sabemos, no hay trabajos publicados con sólo la variante normal, ya sea *in vivo* ni tampoco *in vitro*, los resultados son muy interesantes aunque aún incompletos, muestran su avance y los pasos para terminar este trabajo. Finalmente, en esta introducción revisamos los aspectos centrales de nuestro trabajo: hipertrofia cardíaca, función del gen H-Ras a nivel cardíaco, su relación con las vías de señalización, así como la relación entre hipertrofia e insuficiencia cardíaca.

## **2. HIPERTROFIA E INSUFICIENCIA CARDIACA**

**2.1.- Hipertrofia Cardíaca.** Ya que la presencia de mutante oncogénica de RasVal12, con ganancia de función, causa hipertrofia cardíaca (HC), con una histología similar a la cardiomiopatía hipertrófica y disfunción diastólica selectiva (Gottshall 1997) a continuación describimos los principales tipos de hipertrofia y cardiomiopatía.

La HC es una manifestación clínica común de varias enfermedades. Es parte de la respuesta compensatoria del miocardio a una mayor exigencia de trabajo mecánico secundario a lesión cardíaca y a la pérdida de contractilidad, o a la aparición de señales humorales tróficas: por ejemplo el hipertiroidismo o el excesos de catecolaminas.



**Figura 1. Hipertrofia fisiológica y patológica, análisis de tres fenotipos en modelo de hipertrofia de rata:**

- Morfología cardíaca macroscópica, y tamaño de corazones en base a la normalización del peso del corazón vs peso corporal
- Análisis histológico
- Marcadores moleculares de hipertrofia por WB

(Figura tomada del artículo de McMullen 2007)

	Basal	Hipertrofia patológica (bandeo aórtico)	Hipertrofia fisiológica (entrenamiento)
<b>ANP</b>	-	++	-
<b>BNP</b>	-	+++	+
<b><math>\beta</math>-MHC</b>	-	+++	-
<b>SERCA2A</b>	++	+	++
<b><math>\alpha</math>-MHC</b>	+	+ -	+

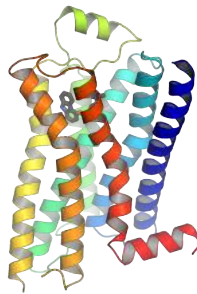
**Tabla I. Expresión de marcadores de HC.** Comparación cualitativa entre la hipertrofia fisiológica y patológica, (de la figura 1c, McMullen y Jennings 2007). **Abreviaturas:** ANP: atrial natriuretic peptide. BNP: brain natriuretic peptide.  $\alpha$ -MHC: alfa myosin heavy chain.  $\beta$ -MHC: beta myosin heavy chain. SERCA2A: bomba de calcio de retículo sarcoplásmico 2A.  $\alpha$ -Sk Actin: Actina alfa de piel.

La hipertrofia cardíaca es una de las respuestas compensatorias más importantes, presente en situaciones fisiológicas y como respuesta inicial en diversas cardiopatías:

- Estímulos físicos (mecánicos) de sobrecarga sistólica: ya sea por incremento de presión (hipertensión arterial), o de volumen, lo que causa sobrecarga del trabajo cardíaco.
- Activación hormonal: agentes alfa-adrenérgicos (epinefrina y nor-epinefrina) que causan HC, por ejemplo en modelos experimentales en que son inyectados, o en situaciones clínicas por ejemplo en el feocromocitoma. También puede estar causada por otras hormonas como angiotensina o endotelina.
- Alteraciones cardíacas como la insuficiencia valvular, o el infarto al miocardio
- Alteraciones genéticas como las miocardiopatías primarias

Los agentes adrenérgicos mejoran la contracción cardiaca por medio de la interacción con sus receptores, acoplados a GTPasas heterotriméricas de la familia Gq, también llamados receptores serpentina, lo cual puede causar directamente la hipertrofia aún en ausencia de sobrecarga mecánica.

El sistema renina-angiotensina (RAS) se ha identificado como otro contribuyente principal en el desarrollo de hipertrofia y de insuficiencia cardiaca congestiva. El efector primario del sistema RA es la angiotensina II (AT-II), ésta se une y activa a dos receptores distintos AT-R<sub>1</sub> y AT-R<sub>2</sub>. Aunque la mayoría de sus acciones biológicas están mediadas a través del receptor AT-R<sub>1</sub>. El bloqueo de los receptores de angiotensina por medio de su antagonista candesartan, fármaco utilizado como antihipertensivo y contra la insuficiencia cardiaca, inhibe a la AT-II por mecanismos competitivos (Labeche et al. 2001)



**Figura 2.** Modelo tridimensional del receptor de fenilefrina, GPCR (G Protein-Coupled receptor).

La hipertrofia es inicialmente una respuesta benéfica del miocardio a una situación de estrés, ya sea hormonal o física, mediante el incremento de la masa muscular. Aunque el proceso es inicialmente compensatorio, parecido a una hipertrofia fisiológica, si se mantiene la etiología, la hipertrofia fisiológica cambia por una de tipo patológico en la que el miocardio se vuelve disfuncional. En muchas enfermedades, la magnitud inicial de la HC es un indicador pronóstico de disfunción cardiaca subsecuente (Hunter et al. 1995).

Así pues, teóricamente, la hipertrofia no se acompaña de respuesta celular proliferativa; esto es, se trata de hipertrofia y no de hiperplasia celular, esto se basa en el principio de que los miocardiocitos diferenciados de adulto no proliferan, por lo que se ha propuesto que la hipertrofia no está condicionada por hiperplasia (Schoenn, 2001).

El estímulo hipertrófico incrementa la síntesis de proteínas, de sarcómeros, de mitocondrias y finalmente de masa muscular. Esta respuesta también activa genes de respuesta inmediata temprana y de formas embrionarias de proteínas contráctiles. La HC activada por receptores adrenérgicos alfa1, activa la expresión de algunos subgrupos de proteínas dentro de las cuales se encuentran:

- a) Genes inmediatos tempranos, por ejemplo: fos, jun, erg-1,
- b) Reactivación de genes embrionarios: factor natriurético atrial (ANF),  $\beta$ -MHC (beta myosin heavy chain) y alfa actina esquelética.
- c) Proteínas de organización miofibrilar, por ejemplo: MLC-2 (myosin light chain-2) (Hoshijima 1998, Sah 1996).

**El dogma de no replicación de células cardiacas.** Previamente hemos dicho que en la hipertrofia no hay hiperplasia, y hemos remarcado que esto es *teóricamente*; pues a principios del presente siglo se demostró falso el dogma de que el corazón fuera un órgano con células en estadio post-mitosis

únicamente, y que por tanto las células cardíacas no podían replicarse. Este dogma fue descartado por Piero Anversa y Bernard Nadal-Ginard, quienes demostraron cardiocitos en mitosis en corazón en período post-infarto (Nadal-Ginard 2003), así como quimerismo de cardiocitos con cromosoma Y en varones con corazón transplantado de mujer (Anversa 2006). Sin embargo, este fenómeno de replicación de cardiomiocitos, parece ser muy limitado, y muchos datos muestran que la hipertrofia cardíaca está condicionada por una hipertrofia a nivel celular.

**2.2. Insuficiencia Cardíaca (IC).** La IC se ha convertido en un problema prioritario de salud de difícil solución. Así, mientras la mortalidad por infarto cardíaco ha descendido en los últimos 20 años, la mortalidad por IC sigue en incremento. Aunque en estadísticas de mortandad la insuficiencia no aparece, pues más bien se contabiliza la enfermedad de origen, ésta suele ser el evento final de varias enfermedades tanto cardíacas como sistémicas. Generalmente se desarrolla en tres estadios.

- a) Un estadio temprano de hipertrofia compensatoria a estímulos patológicos, con mantenimiento o mejoría de la función ventricular. Esta hipertrofia se da como respuesta al estrés o sobrecarga en pared ventricular.
- b) La sobrecarga persistente evoluciona a hipertrofia patológica, que finalmente lleva al tercer estadio.
- c) La insuficiencia cardíaca congestiva, caracterizada por estadios descompensados con depresión contráctil, fibrosis y endurecimiento cardíaco (Liau et al. 2001). Los cardiomiocitos con insuficiencia tienen menor fuerza sistólica y menor capacidad de relajación durante la diástole; según se ha comprobado en estudios con tiras de músculo cardíaco provenientes de corazones con insuficiencia. La IC suele ser la causa secundaria de muerte en muchas enfermedades cardíacas, diabetes, obesidad e hipertensión, entre otras, el evento final suele desencadenarse por arritmia cardíaca, causada por la insuficiencia.

Así pues, la hipertrofia patológica y la IC son dos síndrome estrechamente asociados, inclusive en muchas ocasiones son dos etapas de la misma enfermedad. Ambas son complicaciones de diversas enfermedades cardíacas, siempre que se produce una sobrecarga: valvulopatías, cardiopatías hipertensivas, cardiopatía isquémica, o por daño genético como las miocardiopatías primarias. Pero mientras la hipertrofia compensatoria es una situación más bien fisiológica, la IC es francamente patológica, desencadenando la muerte por arritmia.

La IC también puede ser consecuencia de varias enfermedades sistémicas, sin el paso previo de hipertrofia, como son la insuficiencia renal, diabetes, Alzheimer o inclusive la senescencia.

Cuando el corazón hipertrófico sufre una transición a IC, ésta se mantiene muchas veces, aún cuando el estímulo hipertrófico se remueva; lo que sugiere la existencia de un programa celular, probablemente regulado por las vías de transducción de señales, que activan la IC. Aunque no es el caso del gen Ras, que en modelos experimentales de transgénesis con promotor inducible, al discontinuarse el inductor, los corazones regresan a la normalidad (Wei 2011).

La IC es un grave problema entre pacientes de edad avanzada, sobretodo en países con una economía desarrollada (Liao 2001), también en países con la llamada economía emergente como China o México, donde los problemas cardiovasculares son ya desde hace algunos años la primera causa de mortandad. En México carecemos de estadística específica para IC. Pero el país pasó un período de transición epidemiológica, donde las enfermedades infecto-contagiosas son ya causa secundaria de mortalidad (Blair 2013). Considerando que la IC es la principal complicación en problemas tan diversos como infarto al miocardio, hipertensión arterial, diabetes, obesidad, insuficiencia renal y aún la misma senectud; considerando que México es el país con uno de los índices más altos de diabetes y obesidad,

actualmente debe ser una de las principales causas de mortalidad, aunque la IC no aparezca en las listas de mortalidad, pues más bien se reporta la causa inicial, pero es la causa última de muchos de estos fallecimientos.

**Insuficiencia cardíaca y apoptosis.** La etiología de la IC involucra múltiples agentes y condiciones, pero hay evidencias de que la apoptosis parecería ser la forma de muerte celular más importante en IC: hay un incremento de apoptosis durante la transición a IC en la rata hipertensiva espontánea (Kang e Izumo 2000). Sin embargo, hay mucha controversia acerca del papel de la apoptosis en insuficiencia cardíaca; en la revisión de Izumo sobre apoptosis e IC muestran una lista de 35 artículos que apoyan ésta hipótesis contra sólo 7 que no la asocian con apoptosis, algunos autores han propuesto también que más que apoptosis, podría haber mecanismos de necrosis, que es diferente a la apoptosis. Dado que nuestro trabajo analizó la hipertrofia, no abundaremos más en la insuficiencia cardíaca, pero la tenemos en mente, pues un trabajo posterior será analizar el papel de Ras en la modulación de la IC.

**2.3.- Principales tipos de cardiomiopatía (CMP) hipertrófica.** La disfunción cardíaca es un fenómeno frecuente, pero generalmente secundario a alteraciones sistémicas como hipertensión arterial, valvulopatías, etc. La cardiomiopatía en cambio es una disfunción cardíaca primaria (por enfermedad intrínseca del miocardiocito), que es mucho menos frecuente que las secundarias. Existen tres principales tipos de cardiomiopatías: la dilatada, la hipertrófica y la restrictiva (Schoen, 2002), aunque la mayoría son de tipo dilatada.

**Cardiomiopatía dilatada (CMPD).** Se trata de una cardiomegalia con dilatación cardíaca progresiva y falla contráctil sistólica. Se caracteriza por disminución importante del volumen de eyección y menor contractilidad (conocida como disfunción sistólica). Sus principales causas son miocarditis viral (por virus coxsackie), alcohólica o por otros agentes tóxicos como la quimioterapia antineoplásica, y también se ha descrito por desnutrición y déficit de tiamina; la asociada al embarazo en el periparto, así como la cardiomiopatía de origen genético.

Al menos de 20 a 30% de casos de CMPD son de aparición familiar (Schoen, 2002). Su forma de herencia se ha encontrado en todas las variantes, autosómica dominante o recesiva, así como ligada al cromosoma X. En algunos casos son secundarias a deleciones de genes mitocondriales, que provocan fosforilación oxidativa anormal. También se han encontrado en mutaciones de distrofina en casos de distrofia muscular de Duchene y Becker.

**Cardiomiopatía Hipertrófica (CMPH).** Se caracteriza por una cardiomegalia, llenado diastólico anormal y en algunos casos por obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo. Contrario a la cardiomiopatía dilatada en esta hipertrofia el corazón se observa pesado, musculoso e hipercontráctil. La CMPH altera principalmente a la diástole más que a la sístole. Sus características son diferentes a la cardiopatía hipertensiva. El trastorno fundamental es la disminución del volumen de las cámaras cardíacas, y tanto la hipertrofia concéntrica masiva de ventrículo izquierdo, así como su pérdida de distensibilidad disminuyen la fracción de eyección

La CMPH tiene un componente familiar en el 50% de los casos y se transmite con carácter autosómico dominante con expresión variable. Los demás casos son esporádicos. Quizás por mutaciones de Novo, o por herencia autosómica recesiva. Se han descrito defectos genéticos en la cadena pesada de la  $\beta$ -miosina, que es la más frecuente, la troponina T cardíaca, la  $\alpha$ -tropomiosina y la proteína C unida a miosina (Schoen, 2002). También se han observado mutaciones en componentes sarcoméricos que



provocan hipertrofia ventricular asimétrica, desarreglo de miocitos y muerte súbita por arritmia (Zheng et al. 2004).

**Cardiomiopatía Restrictiva.** Se caracteriza por una disminución primaria de la distensibilidad ventricular, que dificulta el llenado del ventrículo durante la diástole; su contracción sistólica suele estar normal. Su etiología puede ser idiopática, o asociarse a diversas enfermedades del miocardio, como fibrosis por radiación, amiloidosis, sarcoidosis o por errores congénitos del metabolismo.

**2.4. Bases fisiológicas de la contracción de miocardiocitos.** La contracción del cardiocito, muestra que su excitación puede iniciarse de manera eléctrica o química. El acoplamiento entre la excitación y la contracción se realiza por medio de los iones de calcio: un primer estímulo abre los canales de calcio tipo L disparados por voltaje en membrana celular. Estos permiten la entrada de pequeñas cantidades de calcio, activándose los receptores de rianodina, que son canales que permiten la liberación de grandes cantidades de  $\text{Ca}^{++}$  desde las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico (Hajjar 2000). Esto activa a los miofilamentos, por medio de fijación de calcio a la troponina C, provocando el desplazamiento lateral de la tropomiosina, lo que produce finalmente el deslizamiento de actina sobre miosina, que es propiamente la contracción (Mihailescu, 2005).

La concentración citoplásmica de calcio durante el reposo es de  $10^{-7}$  M, aumenta cien veces (hasta  $10^{-5}$  M) para producir la contracción (Mihailescu, 2005). Por el contrario, la relajación se inicia al disminuir la concentración intracelular de calcio. Se recaptura aproximadamente el 75% de  $\text{Ca}^{++}$  en retículo sarcoplásmico por la bomba de ATPasa llamada SERCA2a (Sarcoplasmic Reticulum Ca ATPase), el resto de  $\text{Ca}^{++}$  se eliminará al espacio extracelular por extrusión, por medio de dos proteínas transmembranales el intercambiador de Na-Ca y la ATPasa de calcio de sarcolema, aunque esta segunda parece más importante que la primera durante la contracción cardiaca (Mihailescu 2005). La activación de SERCA2a la realiza el fosfolamban; éste regula a SERCA inhibiéndolo constantemente, hasta que se fosforila por la proteína cinasa dependiente de AMPc, permitiendo que SERCA2a recapture calcio al retículo sarcoplásmico (Hajjar 2000).

### 3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN CARDIOCITO

**3.1. Introducción a las vías de señalización.** Las vías de transducción de señales están formadas por cascadas de proteínas, que transmiten señales desde el medio extracelular, a través de mecanismos diversos: hormonas, factores de crecimiento, receptores celulares, transductores mecánicos, etc., localizados generalmente en membrana celular o intracelularmente, y que activan factores de transcripción (Fig. 4). Estas vías no son aisladas, sino que se comunican ampliamente entre sí, y constituyen una red de transducción de señales más que un simple conjunto de vías.

Contrastando con el amplio conocimiento que se tiene de las hormonas, las vías de señalización están, para fines prácticos, en fase de descubrimiento. Aunque se conocen muchos detalles de éstas: las proteínas involucradas, su estructura proteica, las redes que forman, los mecanismos de activación por fosforilación o defosforilación, etc., quedan aún grandes detalles por descubrir.

Hay varias razones para este conocimiento limitado de las vías, en parte por lo reciente de los descubrimientos: los primeros oncogenes, que son las proteínas clave en las vías de transducción señales, se descubrieron hace cuarenta años, poco tiempo comparado, por ejemplo, con las hormonas que se conocen desde principios del siglo pasado. Su localización intra-citoplásmica también dificulta su

estudio. Pero la principal razón para su conocimiento limitado es la alta complejidad de la red, formada por miles de proteínas, y sin una estructura lineal. Es útil compararlas con las vías metabólicas, y que son sistemas lineales: El ciclo de Krebs tiene prácticamente las mismas enzimas y pasos, con pocas variables, desde los organismos eucariontes más sencillos hasta el ser humano.

Las vías de señalización en cambio, desde el nivel de membrana celular son complicadas: Ras, por ejemplo, puede activarse por decenas de estímulos tan diversos como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, interleucinas, señales mecánicas, etc., etc.

Intracelularmente el mecanismo de transducción de señales, está formado por una red de varios miles de proteínas, organizadas en cascadas de activación, interconectadas entre sí por una compleja red de vías, el llamado *crosstalk*. Una señal que comienza en su receptor de membrana, puede activar simultáneamente varias vías de señales ampliando y modulando la señal.

Finalmente, las cascadas activan, a nivel nuclear a varios factores de transcripción, cada uno de ellos puede activar la expresión de uno o varios genes distintos, por lo que cada factor de transcripción, *per se*, tiene efectos muy diversos dependiendo del grupo de proteínas que activó, las células donde actúa, etc. Hornberg expresa mejor esta idea:

*“La complejidad de la red de traducción de señales es abrumadora, por el gran número de constituyentes que interactúan, por la complejidad del circuito, porque involucra redes y mecanismos de retroalimentación, pro-alimentación (feed-forward), e intercomunicación (cross talk) y por el hecho de que la cinética de la interacción es muy importante. Las decisiones celulares con respecto a la división, diferenciación y apoptosis, involucra señales de transducción” (Hornberg 2005).*

A la vez que es un sistema sumamente complejo, está regulado y controlado con toda precisión. No es exagerado decir que es todo un universo dentro de la célula.

**3.2. Vías de señalización en cardiomiocito.** En la célula muscular cardíaca, las vías de señalización también regulan la mayoría de funciones celulares, y son clave en hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Chien 2004, Petkova 2000, Izumo 1998). Se sabe que la expresión de mutantes activas de algunas moléculas de estas vías de señales, causan hipertrofia, por ejemplo Ras (Gottshall 1997), o la subunidad alfa de las proteínas G triméricas Gαq (D’Angelo 1997, Adams 1998, Sakata 1998), la proteína cinasa C-β (Bowman 1997) y la calcineurina, así como una molécula clave en esta vía, que es el factor nuclear NF-AT3, entre otras pueden causar hipertrofia cardíaca. Por otro lado se ha demostrado que tanto Gαq, calcineurina y Ras están sobre-expresados en hipertrofia cardíaca patológica o como respuesta a estímulos fisiológicos de hipertrofia (Choukron 1999).

Otro ejemplo que muestra la importancia de estas vías en cardiocito, es la activación de hipertrofia o insuficiencia cardíaca por estímulos exclusivamente hormonales, que finalmente funcionan a través de la vía de señales. Por ejemplo, la hipertrofia activados por la inyección de fenilefrina por tiempos prolongados, o la insuficiencia cardíaca secundaria al exceso de angiotensina II por insuficiencia renal. Hasta los estímulos mecánicos, como el estiramiento de células cardíacas, se regulan por estas mismas vías de señales (Duquesnes 2009).

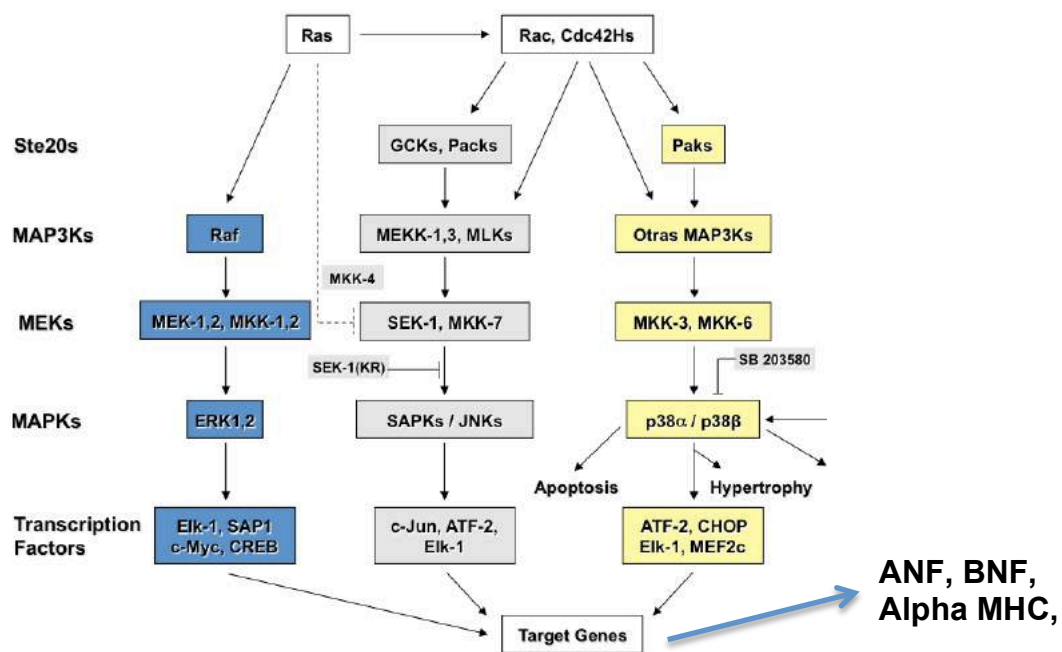
Ras fue el primer oncogén estudiado en células cardíacas: desde los primeros ensayos transfiriendo su mutante activa Ras-Val12, demostró actividad hipertrofiante. Pero no es la única proteína ni vía asociada con ésta:

- Ras activa varias vías de transducción de señales, en primer lugar a la propia vía Ras que incluye ERK 1 y 2 (Cinasas reguladas extracelularmente), así como a las otras 2 familias de proteínas-cinasas

activadas por estrés: las SAPK también conocidas como c-Jun N-Terminal cinasas o JNK's y a p38. Tanto JNK como p38 pertenecen a la súper familia de MAPK (Figura 3).

- La subunidad alfa de las GTPasas triméricas  $G\alpha_q$ , asociada a fenilefrina se asocian a HC (D'Angelo 1997, Adams 1998, Sakata 1998) así como la proteína-cinasa C- $\beta$ , PKC (Bowman 1997).
- Especial mención a la calcineurina, activada por niveles altos de calcio en la célula, así como uno de sus efectores, el factor nuclear NFAT3, son activadores de la hipertrofia patológica.
- También se ha demostrado que tanto  $G\alpha_q$ , calcineurina y Ras están sobre-expresados en hipertrofia patológica (Haq 2000).

Posteriormente Fuller (1998) demostró que la expresión de tres componentes de la vía de señales de Ras: Src-F527, su propia variante oncogénica Ha-Ras-V12 o v-Raf (variante oncogénica de Raf), incrementan la expresión de los llamados genes fetales cardiacos, asociados con la hipertrofia cardiaca patológica: ANF (Atrial Natriuretic Factor), SkM- $\alpha$  Actina (Skeletal Muscle  $\alpha$  Actin) y  $\beta$ -MHC (Beta Myosin Heavy Chain).



**Figura 3.** Esquema de las tres principales vías de señales de hipertrofia a nivel cardiaco.

En 1999 Gabriel Choukron comentaba que aunque estos estudios identifican bien las vías asociadas a hipertrofia, apenas se comenzaba a conocer su papel preciso en HC e insuficiencia. Aunque han pasado más de 15 años, el tema de vías de señales a nivel cardiaco aún requiere mucho trabajo; a pesar de que de 1990 al 2005 se trabajó ampliamente el tema, posteriormente muchos grupos de investigación que trabajaban las vías en cardiocito, modificaron sus líneas de investigación hacia temas con posibilidades de aplicación clínica más directa, como los genes asociados con insuficiencia cardiaca (SERCA2a y fosfolamban, por ejemplo, ambos estudiados por Roger Hajjar) o hacia el tema de células madre, dejando muchas veces de lado el tema de vías de señalización.

**3.3. Activadores hormonales de las vías en cardiomiocito.** El primer nivel de proteínas asociadas a las vías de señales es el extracelular, formado por hormonas y factores de crecimiento que activan a los receptores de membrana celular.

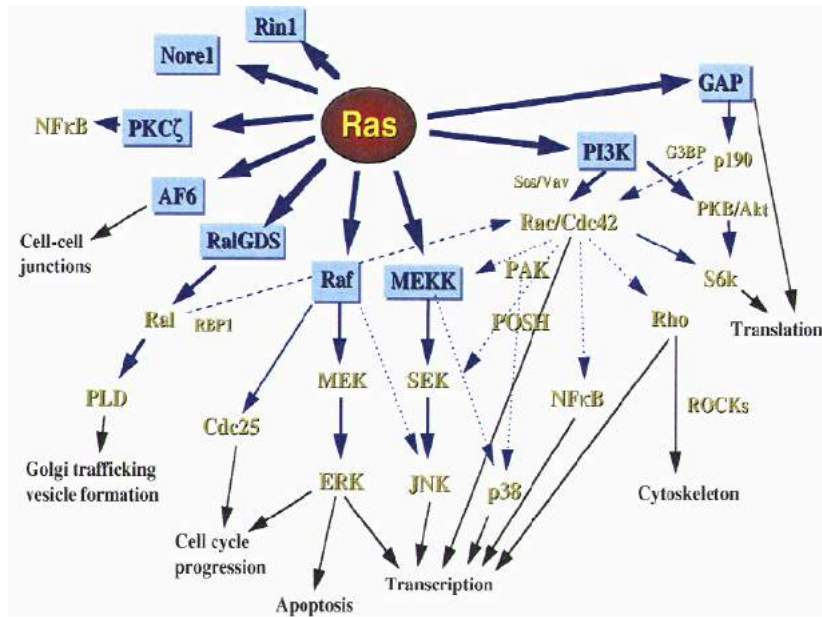
En corazón hay cuatro principales hormonas asociadas a hipertrofia e insuficiencia: la adrenalina, la Angiotensina-II (AT-II), endotelina I (ET I) y noradrenalina, las cuales ejercen su acción a través de la activación de sus receptores que activan a las cascadas de cinasas. En el presente trabajo experimentamos con AT-II y con fenilefrina, un activador alfa adrenérgico con efectos similares a la adrenalina. Djamel Labeche ha demostrado que la inhibición de AT-II con Candesartan inhibe la fosforilación de las tres principales cascadas de cinasas: ERK, SAPK y p38 (Labeche 2001).

Los sistemas adrenérgicos y angiotensina tienen interacciones estrechas. Ras es intermediario en todas las vías de señales que se han estudiado, activadas tanto por AT-II, PE, endotelina, así como en estímulos mecánicos, etc.

Niveles hormonales altos y por períodos prolongados activan hipertrofia y/o insuficiencia cardíaca. La secreción renal de AT-II por insuficiencia renal, por ejemplo, es causa frecuente de insuficiencia cardíaca sin pasar por hipertrofia.

**3.4. Ras como parte de las vías de señalización.** Ras es parte de este sistema complejo de vías, ayudando a regular funciones celulares variadas y a veces contradictorias (Figura 3). Es intermediario de muchas hormonas, y puede activar o modular prácticamente todas las respuestas celulares desde proliferación hasta apoptosis (Vojtek y Der 1998, Campbell 1998). Ras se asocia con tantas funciones, que esto se ha descrito como efecto *pleiotrópico*: *“Estudios en la vía de señales Ras han demostrado que este activador pleiotrópico, puede estimular respuestas diversas y hasta antagónicas, como proliferación celular o arresto de crecimiento, senescencia o diferenciación, y apoptosis o sobrevivencia. El resultado preciso parece depender en el tipo celular y el contexto biológico bajo investigación”* (Frame y Balmain, 2000).

Aunque la primera función conocida de Ras fue la activación de mitosis, por lo que se clasificó como oncogén, pues su sobre-activación suele causar cáncer en algunos tejidos. Está asociado principalmente con cáncer de páncreas, colon, pulmón, e incluso de neuroblastoma por mutación de N-Ras. Interesantemente, la excepción parece ser el miocardio, donde en lugar de proliferación, causa hipertrofia.



**Figura 4. Complejidad de las transducción de señales asociadas a Ras.** Este esquema muestra la complejidad de la red de señales, y en este caso tan sólo para Ras. Este gen puede interactuar de modo directo con 9 efectores distintos, y terminar en funciones tan diversas como progresión del ciclo celular, apoptosis, tráfico de vesículas de Golgi, citoesqueleto, etc. .

Ras pertenece a la familia de GTPasas pequeñas, las cuales son una súper-familia de proteínas que actúan como intermediarios entre las señales externas y las vías de señalización intracelulares. La subfamilia Ras es la más importante de estas GTPasas y tiene cuatro variantes homólogas: H-Ras, N-Ras, K-RasA y K-RasB. La estructura primaria de los cuatro genes es sumamente parecida, con una función muy similar entre ellos, de hecho como veremos más adelante, la ausencia de uno o hasta dos de ellos puede pasar por situación normal en animales experimentales. Se expresan de manera ubicua, con variaciones de expresión y función en tejidos adultos y embrionarios.

¿Cuál es la combinación de factores por la que Ras o cada vía de señales provocan respuestas celulares tan diversas?. Esta es una pregunta para la que se tienen sólo respuestas parciales. En términos generales diremos que es un fenómeno multifactorial, pero que el control está a nivel de las vías de señales, y de las Redes de Regulación Transcripcional, pero sigue sin responderse con precisión cómo se regulan estos fenómenos.

**Ras en músculo esquelético.** Es útil hacer una breve comparación de la función de Ras en los dos tipos de músculo estriado. Debemos considerar que, contrario al cardiocito, la célula muscular sí se replica. La expresión de Ras oncogénico en músculo esquelético, en cambio, induce rápida proliferación aunque evita su maduración (Thorburn 1993).<sup>1</sup> También se ha reportado, paradójicamente, que la expresión de la DN-Ras N17 en músculo esquelético incrementa la proliferación de tejido muscular (Dusquesnes 2009).

**Ras y fenilefrina.** Desde los primeros estudios de Ras en corazón se demostró que es intermediario en la hipertrofia inducida por PE (Thorburn 1993, Thorburn 1994) y que ésta aumenta la concentración de Ras-GTP (Ramírez 1997). También se demostró que una dominante negativa de Ras (DN-Ras), la Ras-A15, bloquea el efecto de PE sobre los cardiomiocitos, disminuyendo la expresión de ANF inducida por PE (Thorburn 1993). Posteriormente Fuller demostró que otra DN-Ras, DN-Ras-N17 –la dominante negativa de H-Ras más estudiada y que utilizamos en los experimentos de la presente tesis– era capaz de

<sup>1</sup> Artículos 6-8 citados en Thorburn 1993

bloquear el efecto de la mutante activa de Src F527,<sup>2</sup> (Thorburn 1993, Fuller 1998) pero en cambio la DN-Raf no bloquea el efecto de SrcF527, sugiriendo que la señal de Src sí pasa por Ras, pero esquiva Raf.

**Angiotensina-II.** Tanto los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA, como el captopril) como el inhibidor competitivo, candesartan son buenos ejemplos de la función dinámica de la vía Ras-MAPK, pues el primero de estos fármacos inhibe la formación de angiotensina (a partir de angiotensinógeno) y el segundo bloquea al receptor de angiotensina (AR), ambos son utilizados en hipertensión arterial a fin de prevenir o reducir la insuficiencia cardíaca. Su mecanismo de acción ayuda a comprender mejor el papel de la vía Ras/MAPK, pues bloquea específicamente varias moléculas de esta vía.

Candesartan es un inhibidor competitivo de AR, bloqueando el sitio de unión a AT-II. En nuestro trabajo encontramos que la DN-Ras bloquea más a la señal proveniente de AT-II que la señal de PE. Este efecto sugiere que la AT-II activa la vía Ras, mientras que la PE activa otras vías. Candesartan normaliza la interacción entre Ras-Raf y entre Raf y MEK, pero éste fármaco no normaliza la interacción Ras-Rap1. Isoproterenol incrementa la asociación entre Ras y Rap1, así como la interacción de Raf con MEK.

En esta tesis encontramos que la DN-Ras inhibe la señal de AT-II; el cual es un efecto similar al Candesartan. Podemos adelantar que la similitud del efecto de la DN-Ras con el Candesartan, es un dato que sugiere que la DN-Ras puede aplicarse en clínica.

**3.5. Papel de -Ras en la respuesta hipertrófica.** Los dos primeros efectos descubiertos en la hiperactividad de -Ras en cardiocito *in vitro*, contrario a lo que sucede en la casi totalidad de tejidos, es que no induce proliferación, sino que produce hipertrofia (Thorburn 1993). En ese mismo trabajo se describió que RasVal-12 activa la expresión ANF y c-Fos, y que está asociada con HC.

La capacidad de Ha-Ras-Val12 para inducir las características morfológicas y cambios transcripcionales de hipertrofia primaria, de los cardiomiocitos neonatales de rata, NRCM (principal tipo de cultivo primario utilizado para ensayos *in vitro* de miocardiocitos) (Fuller 1998), o a nivel cardíaco caracterizado por desarreglo histológico de miocitos, fibrosis miocárdica variable, sobre-expresión selectiva de ANP, disfunción diastólica selectiva, similar a la enfermedad cardíaca hipertensiva no compensada (Gottshall 1997).

**Efecto de Ras en la estructura sarcomérica.** Aunque Thorburn (1993) afirmó que la transferencia del gen Ras-Val12 incrementaba las miofibrillas, en cardiocitos *in vitro*, Fuller encontró lo contrario, Ras-Val12 y Src-F527 aumentaron el tamaño de las células, pero no incrementaron la génesis de miofibrillas ni la organización del aparato contráctil en sarcómeros, que por contraste, tanto Endotelina I como la PE sí lo incrementan.

En nuestro trabajo corroboramos esto: Ras Val12 incrementa el tamaño del cardiocito con desorganización miofibrilar importante, mientras que la DN-Ras disminuye el tamaño celular pero mejoró la organización sarcomérica, similar a lo observada con fenilefrina.

**3.6. Efecto de Ras-Val12 en corazón *in vivo*.** Es claro que la hiperactividad de H-Ras en el cardiomiocito, se asocia con la hipertrofia: Desde los primeros ensayos *in vivo* en ratones transgénicos Ras Val12, regulados por el promotor cardio-específico MLC2V (Myosin Light Chain 2V), mostraron que la función excesiva de Ras induce HC con disfunción diastólica selectiva. Ésta se caracteriza por

---

<sup>2</sup> la dominante activa de Src que mencionamos previamente

prolongación selectiva de la relajación cardíaca similar a la cardiomiopatía hipertrófica familiar en humanos, aunque también mostró parecido con la hipertrofia compensada (Hunter 1995). Ratones transgénicos que expresan Ras-Val-12 a nivel cardíaco, tanto de manera constitutiva (Gottshall 1997), como inducible (Zhang 2004, Wei 2011) muestran HC. Zhang además encontró que los ratones transgénicos Ras-Val12, desarrollan primeramente hipertrofia y hasta después cursan con insuficiencia cardíaca letal (Zheng 2004).

El análisis histológico demostró desarreglo miofibrilar parecido a la cardiomiopatía hipertrófica familiar en humanos (Zheng 2004). Este autor también encontró que la severidad de la hipertrofia depende del nivel de expresión de Ras. Una baja expresión de Ras produce un cuadro leve, mientras que una alto nivel desarrolla una HC severa que se parece en muchos aspectos a la cardiomiopatía hipertrófica humana en estadios avanzados (Zheng 2004).

En pacientes con cardiomiopatía hipertrófica causada por mutaciones de genes musculares cardíacos como la proteína  $\beta$ -MHC (Beta Myosin Heavy Chain), Kai y sus colaboradores (1998) demostraron por biopsia y RT-PCR una correlación directa entre el tamaño de los miocardiocitos y la sobre-expresión de Ras y Myc. Mientras que no encontraron sobre-expresión de Ras en pacientes con HC pero sin mutación (contrario a lo observado por Chouckron). Finalmente, pacientes con el síndrome de Costello causado por mutantes activas de Ras, desarrollan cardiomiopatía hipertrófica con taquicardia (Schulz 2008).

**Ras y  $Ca^{++}$  intracelular.** Zheng (2004) demostró que la disfunción diastólica en ratones transgénicos Ras-Val12 se debe a una disminución de recaptura de  $Ca^{++}$  más que la fibrosis causada en los corazones, demostrando que el incremento en  $Ca^{++}$  intracelular incrementa la actividad de NFAT:

$$\uparrow \text{Actividad de Ras} = \downarrow \text{recaptura de } Ca^{++} = \uparrow Ca^{++} \text{ ICel} = \uparrow CaN = \uparrow NFAT$$

Concretamente demostraron que células con Ras-Val12, el tiempo de relajación del V1 ( $\tau$ ) se prolongó en condiciones basales en los cardiocitos transfectados con Ras-Val12 contra los controles, dando un tiempo de  $\tau$  de 15.9 +/- 4 ms en ratones Ras-Val12, contra 10.6 +/- 2.1 en ratones control (Zheng 2004).

La disminución de corrientes de calcio intracelular transitorias (Ica) en estos cardiocitos transferidos con Ras-Val12 pueden estar causadas por: a) defectos en la recaptura de  $Ca^{++}$  durante la diástole por la hipo-fosforilación de fosfolamban en el sitio Ser16; b) disminución de actividad o concentración de SERCA2a (Zheng 2004).<sup>3</sup>

**3.7. Factores de transcripción activados por Ras.** Los principales efectos celulares de Ras se activan al final de la cascada de cinasas, que son los inductores de expresión o factores de transcripción; estos son los efectores finales de las vías de señales. Estos promotores son los que realmente regulan a la célula. Por mencionar un claro ejemplo de la importancia de los factores de expresión, la inducción de células adultas a estadios embrionarios tempranos en las células iPS (células pluripotentes inducidas) se logra por medio de los promotores de transcripción Nanog, Sox, Myc y Oct4 (Takahasi y Yamanaka 2006).

Dos promotores específicos en células cardíacas son el Tbx5, asociado con el síndrome de Holt Horam, también conocido como síndrome de malformación corazón-miembro superior, caracterizado por

---

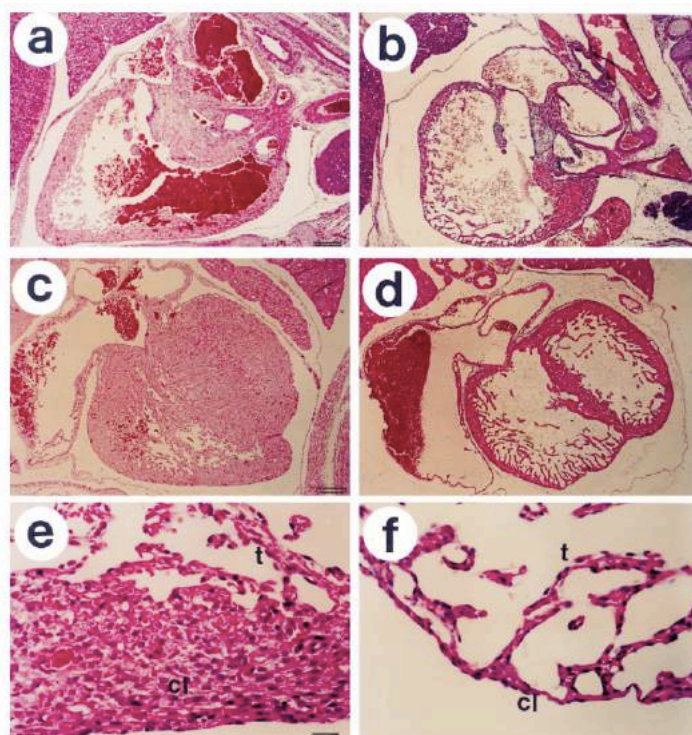
<sup>3</sup> En este sentido, el incremento de SERCA por la DN-Ras que observamos en nuestro ensayo, reportado sólo aquí en la tesis, en la Fig. 22 de esta tesis, es muy importante.

daño en el septum ventricular y carencia de hueso radial en el brazo. Otro promotor cardiaco es el Nkx2.5, asociado con el síndrome ASD o Atrial Septal Defects familiar, (Jay e Izumo ...).

Ya habíamos comentado que la mutante activa Ras-Val12, activa genes embrionarios como la alfa actina esquelética (Shubeita 1990, JBC, cita 3 de Thornburn 1993), la MLC-2, (Myosin light chain 2), ANF, c-Fos (Thornburn 1993), Beta-MHC (Zheng 2004). Gotshall (1997) corroboró que Ras-Val12 activa genes asociados con hipertrofia, pero a la vez demostró que el incremento de masa cardiaca en la sub-cepa MLC-RasVal12 no se acompaña de activación de todas las isoformas embrionarias de los genes, identificadas previamente en hipertrofia causada por sobrecarga ventricular en roedores (Gotshall 1997).<sup>1</sup>

Es interesante hacer notar cómo es que aún utilizando en ambos casos la misma cepa de ratones, (aunque para el segundo trabajo utilizaron una sub-cepa), el efecto de Ras-Val12 fue diferente y en el primer ensayo se activaron más los genes embrionarios que en el segundo.

**Inhibición de H-Ras en células cardiacas.** La baja funcionalidad de Ras, tanto por deficiencia como por la presencia de mutantes dominantes negativas, contrario a las variantes con ganancia de función, producen hipoplasia cardiaca o efectos anti-hipertroficós. Ratones K-Ras *knock out* mueren en el día 15.5 de embriogénesis, observándose paredes ventriculares muy delgadas, como única causa clara de mortalidad (Koera 1997), mientras que los ratones H-Ras<sup>-/-</sup> y N-Ras<sup>-/-</sup> son normales. Inclusive pueden tener el doble *knock-out*: H-Ras<sup>-/-</sup> y N-Ras<sup>-/-</sup>, y los ratones serán normales (Esteban 2001). Otros ensayos muestran la función afín entre estos tres genes, pues los ratones K-Ras<sup>-/-</sup> restablecen su normalidad, si se les transfiere el gen -Ras (Potenza 2005). Recientemente, Nagalingam (2013) demostró también efecto anti-hipertrofico in vitro por la inhibición de RNA mensajero de genes de la vía Ras, por medio del micro RNA miR-378.



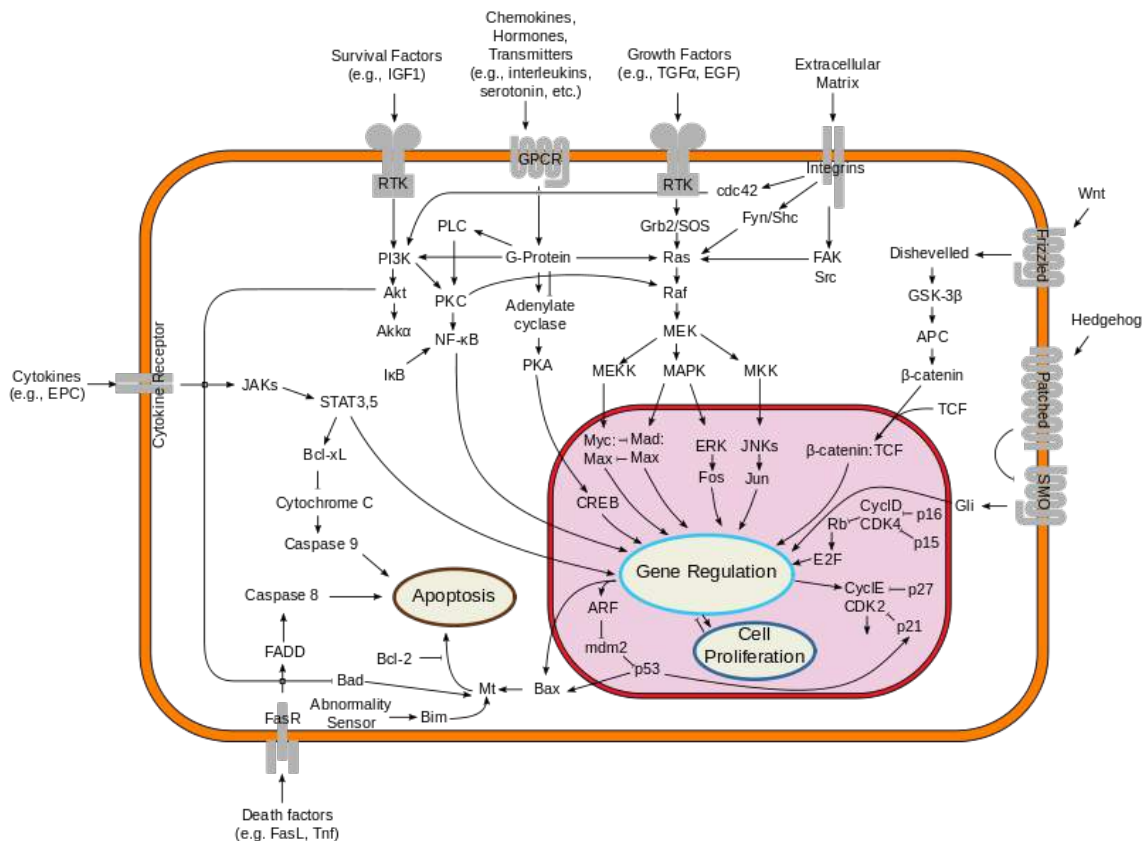
**Figura 5. Comparación de corazón embrionario de ratón normal vs. ratón *knock-out* para K-Ras.** Estadío embrionario 15.5. *a, c* y *e* corazón normal: *b, d* y *f*, corazón con hipoplasia cardiaca por ausencia de gen K-Ras. (*a, b, e, f*) Sección sagital de ventrículo derecho del corazón normal (*a, e*) y K-Ras<sup>-/-</sup>. (*e* y *f*) Son ampliaciones de *a* y *b*, respectivamente (*c* y *d*) son secciones horizontales de los corazones, normal (*c*) comparado con el *knock out* K-Ras<sup>-/-</sup> (*d*) Barras en *a-d*: 400  $\mu$ m; *e-f*: 50  $\mu$ m. Abreviaturas. cl: capa compacta (compact layer). t: trabécula



**Ras y ciclo celular.** A pesar de que en cardiocitos Ras no activa el ciclo celular, sino hipertrofia, en muchos otros tipos celulares Ras sí lo activa, mecanismo central para lograr su oncogenicidad. Analizaremos sus mecanismos en el ciclo en otros tipos celulares, para comprender sus mecanismos a nivel cardíaco. Por ejemplo, anticuerpos anti-Ras inyectados intracelularmente en células HeLa, detienen a la célula en G1. Por otro lado, nuestro grupo de investigación del Dr. Alejandro García-Carrancá demostró que la transferencia de células Hela con la variante normal o la Ras-Val12, incrementan el paso de células de fase G1 a las fases G2 y M (Miranda 1996), aunque la mutante activa detiene a la célula mucho más en estas fase que la variante normal.

Ras activa el paso de G1 S activando las ciclinas D1 y E las cuales defosforilan los dos sitios fosfato de Rb, inhibiéndose éste, (cuya función es mantener a la célula en la fase G1) y liberando el pase de la célula a fase S (Frame and Balmain, 2000). Se ha propuesto que Ras fosforila a Rb a través de p21 vía Rho, p21 activa al complejo de la Ciclina D/Cdk-4,6, fosforilando el primer sitio de Rb, y el segundo sitio lo fosforila a través de la vía ERK, la cual activa a p27 y éste a su vez al complejo de la ciclina E/CDK-2.

Todo lo anterior sugiere que Ras activo inhibe a Rb y da paso a la síntesis de ADN, pero no activa formalmente el ciclo celular, sino solamente la síntesis de ADN (fase S), sin producir necesariamente mitosis, que es lo observado en la catástrofe mitótica en células HeLa, donde las células con Ras-Val12 sintetizan ADN, aumenta el número de núcleos o su tamaño, pero la célula no se dividen (Miranda 1996).



**Figura 6. Esquema general de las vías de transducción de señales.** Obtenida de una revisión y que se añade como referencia a otras moléculas y vías mencionadas en la presente tesis.

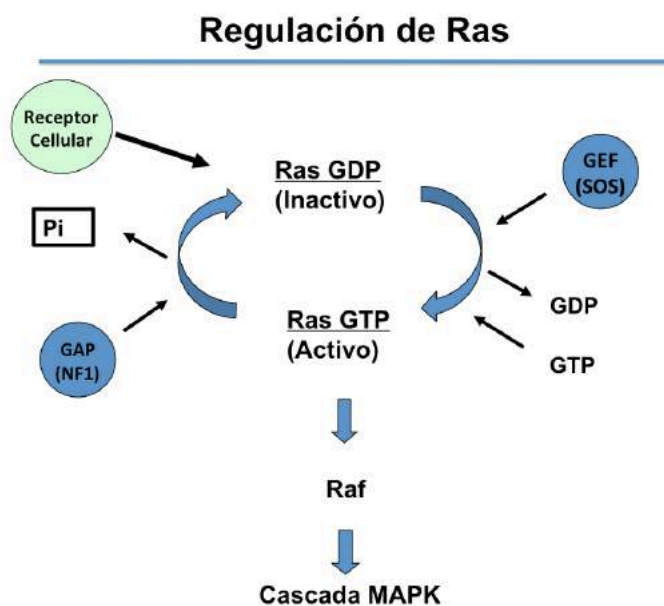
También dentro del grupo del Dr. García-Carrancá, la Doctora Karla Santana demostró que Ras-Val12 activa la expresión de B1 y su localización intranuclear, activando el paso de G2 a M (Santana 2002).

Aunque queda una duda, pues también se estudió en células HeLa: si Ras induce el paso de la célula de G2 a M, ¿está detenido ese paso en la catástrofe mitótica?, ¿o el estímulo no es suficiente para lograr que todas las células logren llegar a M?

Otro mecanismo de Ras para activar el ciclo celular es por la activación de MAPK y la ET-1, éstas activan la expresión de moléculas regulatorias del ciclo celular: ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de las Cinasas dependientes de ciclinas. Estas moléculas contribuyen a la remodelación del sistema cardiovascular, y son claves en la activación de la angiogénesis (Petkova 2000).

En cardiocitos Ras no activa mitosis, fenómeno previamente reportado y que corroboramos en nuestros ensayos. Hasta donde sabemos, se desconoce el mecanismo por el que Ras-Val12 no produce mitosis en cardiocitos, aunque es bien sabido que la célula cardíaca rara vez sufre transformación maligna, aunque están bien reportados los casos de rabdo-miosarcomas,. Sen en 1988 también reportó que las proteínas oncogénicas de origen viral SV40 y el antígeno T grande producen mitosis en miocardiocitos.

**3.8 Neurofibrominaa 1 (NF1), regulador de Ras.** La proteína NF1 regula negativamente a Ras, por medio de su dominio GAP (Proteína Activadora de GTPasa) con el que incrementa la actividad intrínseca de GTPasa de Ras. Así, Ras-GTP, (forma activa de Ras) pasa a Ras-GDP (forma inactiva), regulándose negativamente (Fig. 6). Algunas mutaciones de NF1 disminuyen su función, con lo que Ras-GTP se degrada lentamente a Ras-GDP, con lo que Ras mantiene una alta actividad. Esta es la causa de las neoplasias de células de Schwann llamados neurofibromas.



**Figura 7. Resumen de los mecanismos de regulación del gen Ras.**  
 Abreviaturas: GAP: proteína activadora de GTPasa. GEF: Factor de intercambio de Guanosina. NF1: proteína Neurofibromina 1 que es la GAP de H-Ras.

NF1 tiene un papel especial durante la cardiogénesis, en el tracto de salida cardíaco, una estructura clave en esta etapa formativa del corazón (Lakkis y Epstein 1998). Las estructuras derivadas del OFT se modelan por las células que migran desde el tubo neural a poblar esta área del corazón embrionario, a partir de ésta se forman los tabiques ventricular y auricular, así como la salida de los grandes arterias aorta y pulmonar.

Durante el desarrollo embrionario cardiaco, la NF1 tiene tres principales papeles: a) regula la migración de células endoteliales a la gelatina cardiaca, b) transforma endotelio en mesénquima (tejido fibroso) cardiaco, y c) regula la proliferación celular en cojinetes endocárdicos (Lakkis y Epstein 1998).

Ratones *knock out* NF1<sup>(-/-)</sup>, muestran engrosamiento y mal-rotación de estas estructuras derivadas del OFT, produciendo doble salida del ventrículo derecho,<sup>4</sup> adelgazamiento de su pared, sobreabundancia de tejido esponjoso en cojinetes endocárdicos, por lo que finalmente éstos no maduran y no se forman válvulas semilunares (Lakkis y Epstein 1998).

Esta observación experimental se confirma en pacientes con neuro-fibromatosis. Pacientes con deleciones grandes en el gen NF1 muestran lesiones cardiacas mayores que correspondieron a insuficiencia mitral, defectos de *septum* ventricular, así como estenosis e insuficiencia aórtica.<sup>5</sup> En cambio las mutaciones puntuales de NF1 no mostraron alteraciones en el tracto de salida, pero sobre activan a Ras, causando más bien una cardiomiopatía hipertrófica ecéntrica de ventrículo izquierdo, similar al efecto de Ras oncogénico, y dos pacientes mostraron tumores intracardiacos (Nguyen 2012).

#### 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE RAS

Esta cascada de cinasas Raf-ERK, fue una de las primeras vías de señalización descritas, en células y en la respuesta hipertrófica cardiaca inducida por receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos (Thorburn 1993, Thorburn 1994, Ramírez 1997). Aunque los reportes sobre su papel en hipertrofia e insuficiencia cardiaca suelen ser contradictorios.

Por un lado, esta cascada se ha implicado en la regulación de la respuesta hipertrófica inducida por receptores  $\alpha$ 1 adrenérgicos (Ramírez 1997). Thomas Force (1999) por su parte, propuso que la vía Raf-ERK no es importante en la fisiopatología de la hipertrofia *in vitro*, para esto se basó en el reporte de Ramírez donde la DN-Raf no inhibe la expresión de ANF inducida por fenilefrina (Ramírez 1997).

Ho encontró que ratones transgénicos con ERK activado, sólo presentaron una forma leve de HC con buena contractilidad basal y ausencia de cardiomiopatía (Ho 1998) mientras que Bueno (2002) reportó que ratones transgénicos con MEK1 muestran una hipertrofia importante a los seis meses de edad.

Por su parte el grupo de Kenneth Chien, encontró que la estimulación de cardiomiocitos con PE activa a ERK, pero no tenían claro qué tan involucrada está la vía Raf-MEK-ERK en la hipertrofia. Sobre todo porque ellos encontraron que aunque Raf activo estimula la síntesis de ANF, la DN-Raf no inhibe la expresión de ANF inducida por fenilefrina. Por lo tanto deducen que la activación de MEK y ERK debe ir por otra vía diferente a Raf (Ramírez 1997).<sup>6</sup> Aunque en nuestro trabajo encontramos que sí hay señal vía Raf...

**4.1. Raf.** Entre los múltiples intermediarios de Ras, este es su principal efector. A nivel cardiaco los primeros reportes sugerían que Raf no sería intermediario en hipertrofia, pues en un experimento la DN-Raf no inhibió a la señal de Src-F527 sobre el promotor de ANF-Luc (Fuller 1998). Este experimento junto con la falta de activación de ERK y por c-Raf-1, así como el bajo efecto hipertrofiante de ERK en células cardiacas, hizo que Thomas Force en 1999 sugiriera que no solo Raf, sino que la vía ERK no era

---

<sup>4</sup> Esto es: que el ventrículo derecho se comunica con las dos arterias: aorta y pulmonar a la vez.

<sup>5</sup> Corresponden: insuficiencia mitral (dos pacientes), defectos de *septum* ventricular (dos pacientes), estenosis aórtica (un paciente) e insuficiencia aórtica (un paciente)

<sup>6</sup> Es interesante, pues es lo que vemos con ERK que no es bloqueado por la DN-Ras cuando el estímulo es PE.

“necesaria ni suficiente” para la expresión de varios componentes de la respuesta hipertrófica *in vitro*, y que sólo la vía SAPK y p38 eran intermediarios de la hipertrofia cardiaca.

Posteriormente se demostró que Raf sí está asociado con hipertrofia cardiaca especialmente en los síndromes hereditarios de las llamadas RASopatías relacionados con la vía Ras/MAPK; donde las alteraciones de Ras causan el síndrome de Costello, mientras que las alteraciones de Raf con ganancia de función causan el síndrome de Noonan y LEOPARD (Perundurain 2011), una característica común en estos síndromes es la presencia de hipertrofia cardiaca y malformación facial como parte de la sintomatología.

Especialmente importante es el efecto de la ciclosporina que inhibe la hipertrofia causada por mutaciones con ganancia de función de Raf, siendo que —como hemos visto—Ciclosporina inhibe a la vía de calcineurina-NFAT, vía asociada con la hipertrofia patológica, pero teóricamente independiente de la vía ERK (Perundurai 2011).

**4.2. Cinasa activada por mitógenos (MAPK).** La MAPK, también conocida como ERK (Extracelular Regulated Kinase, ERK-1/2, una proteína dual de 42 y 44 KD), parecía tener un papel moderado en HC, especialmente por el hecho de que ratones transgénicos ERK sólo presentan una forma leve de hipertrofia con buena contractilidad basal y ausencia de cardiomiopatía (Zheng 2004). También ratones transgénicos Ras-Val12 mostraron sobre-expresión de ERK, pero con fosforilación normal, mientras que sí tenían incremento de fosforilación en JNK.

En cambio ratones MEK1 transgénicos (MAPK de la vía Ras), muestran una hipertrofia importante a los seis meses de edad (Bueno 2002). Aunque los primeros reportes del papel de la cascada Ras-Raf-ERK en la hipertrofia fueron contradictorios. Fue hasta algunos años después que se demostró que Raf activa la hipertrofia patológica a través de la vía de calcineurina. Bueno (2002) también demostró que los ratones transgénicos ERK presentan HC importante, aunque sin insuficiencia (Bueno y Molkentin, 2002).

**4.3. Otras vías de cinasas activadas por estrés: SAPK y p38.** Se ha descrito que Ras activa tanto la vía ERK, así como otras dos cascadas de proteínas cinasas activadas por estrés: JNK y p38. Estas tres vías pertenecen a la súper-familia de las vías MAPK, las SAPK's (Stress Activated Protein Kinase), conocidas por el nombre de su molécula final, la cinasa activadora del factor de transcripción: la vía JNK (Jun N-Terminal Kinase) (figura 3), las tres en su conjunto se conocen como SAPK (Stress Activated Protein Kinases) están altamente activadas en insuficiencia cardiaca (Fig. 8).

Estas vías MAPK tienen como características común que son cinasas activadas por medio de su fosforilación, por otras cinasas y tienen varios niveles de moléculas de regulación que se describen en la misma figura 3, que son:

- MAP3K o MAP cinasa, cinasa, cinasa que activan a las
- MAP2K o MAP-Cinasa de ERK (MEK) o MAPKK, la cual a su vez activa a las
- MAPK simple, éstas son emblemática para cada vía: ERK, JNK y p38 (Fig. 3)

Analizaremos principalmente la vía ERK, y revisión general de las vías SAPK y p38. Ante varios estímulos las tres vías SAPK se pueden activar, aunque los intermediarios para JNK y p38 se activan principalmente por G $\alpha$ q y Rac 1 (Chouckron 1999) en la respuesta hipertrófica, mientras que el intermediario para la vía ERK es Ras. En ese trabajo Chouckron bloqueó SAPK con una dominante negativa de SEK-1 la mutante SEK(KR) con lo que disminuyeron la hipertrofia en rata. Ratones transgénicos con Ras-Val12, incrementan la actividad JNK, mientras que ERK1 y ERK2 tenían actividad normal (Ramírez 1997).

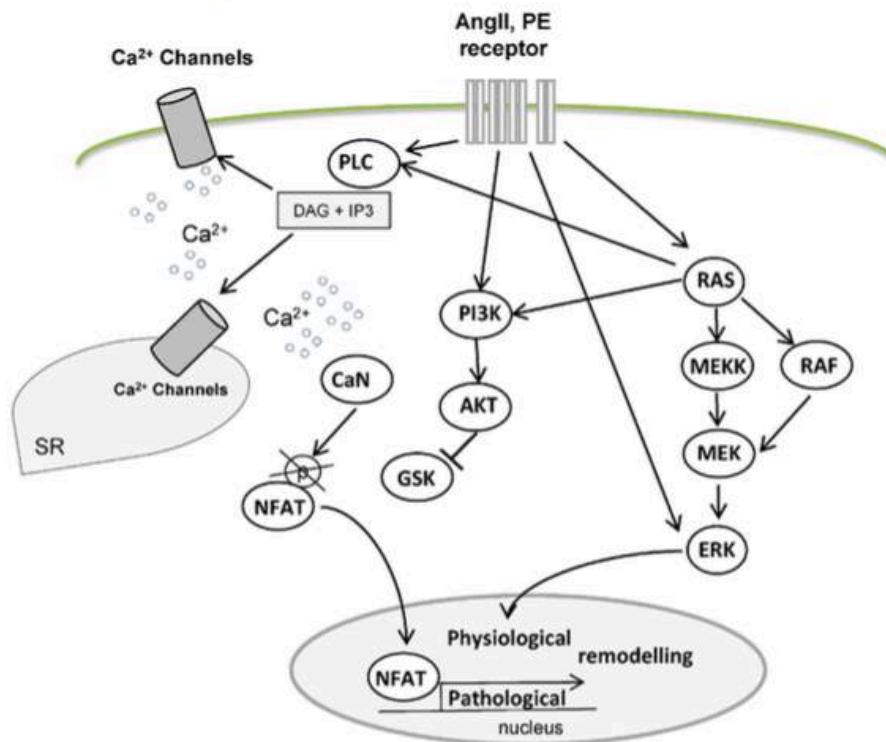
**4.4. Vía de hipertrofia patológica por calcineurina.** Esta vía es independiente a las vías de cinasas (vías ERK, p38 y SAPK) teniendo como principal componente a la calcineurina, la cual es activada por la elevación de concentración de calcio intracelular, además de que es una fosforilasa que defosforila al factor de transcripción NFAT-3 (Factor Nuclear de Linfocitos T). Una vez de-fosforilado, NFAT-3 se activa y transloca al núcleo, donde activa a los promotores de expresión Fos y Jun.

La expresión de calcineurina transgénica en ratones es suficiente para producir hipertrofia, la cual se bloquea con inhibidores de Cn como la ciclosporina A (Meguro 1999, Perundurai 2011). Pero el caso es interesante, pues aunque disminuye la hipertrofia causada por sobrecarga cardiaca, paradójicamente aumenta la sensibilidad a la insuficiencia cardiaca (Chouckron 1999). Este es un buen ejemplo de que la HC, aún la patológica, es una respuesta compensatoria y benéfica al estrés, por lo que su inhibición no es necesariamente benéfica.

La Cn juega un papel clave en el mantenimiento de hipertrofia en humanos. Como se observa en la figura 7, la expresión de calcineurina se mantiene elevada tanto en hipertrofia compensada como en la insuficiencia cardiaca (Haq 2000), aunque un poco menos activa en la insuficiencia.

**4.5. Interacción entre las vías.** Cada vía de señalización es compleja, pero la comunicación entre ellas, también conocido como *cross-talk*, y que traducimos como inter-comunicación es mucho más complicada. Los ejemplos sobran, la fenilefrina activa a la vía adrenérgica que viaja través de la vía  $G\alpha_q$ -Rho, pero también activa a las vías de cinasas Ras-Mapk, p38 y JNK. Esta intercomunicación demuestra que más que simples vías de señales lo que tenemos a nivel intracelular es una compleja red de vías, y que esta red más que simples vías son las reguladoras de la función celular. Esta red da una variedad de respuestas muy amplia, difícil de estudiar y de manipular. Creemos que es una de las razones por las que, en la experimentación con oncogenes, con cierta frecuencia se observan fenómenos paradójicos.

Por ejemplo: El grupo de Chien encontró que la estimulación de cardiomiocitos con PE activa a ERK, y la expresión de ANF; por otro lado, la mutante activa de Raf estimula la síntesis de ANF, pero DN-Raf no inhibe la expresión de ANF inducida por la misma PE. Nosotros observamos que la DN-Ras inhibe la fosforilación de ERK activada por AT pero no inhibe a ERK activada por PE corroborando que la activación de ERK por la PE en ciertas circunstancias puede ir por una vía distinta a Ras.



**Figura 9.** Vía de señalización del gen H-Ras, y sus intermediarios, según se planteó en el artículo central de la presente tesis.

**4.6. Vías de señalización en hipertrofia patológica e insuficiencia cardiaca.** El análisis de la situación de las cuatro principales vías de señales, en pacientes con estas dos alteraciones cardiacas que realizó Haq en 2001 es muy ilustrativo. Tres vías de cinasas: ERK, p38, SAPK y la vía de calcineurina (Fig. 8). Es interesante mencionar que, en ese estudio, nueve de los corazones hipertróficos fueron obtenidos de pacientes con hipertrofia secundaria a hipertensión arterial; otros dos corazones provenían de pacientes con hipertensión arterial e isquemia cardiaca secundaria a enfermedad arterial coronaria. El hecho de ser corazones humanos en situaciones clínicas específicas, hace al estudio especialmente valioso.

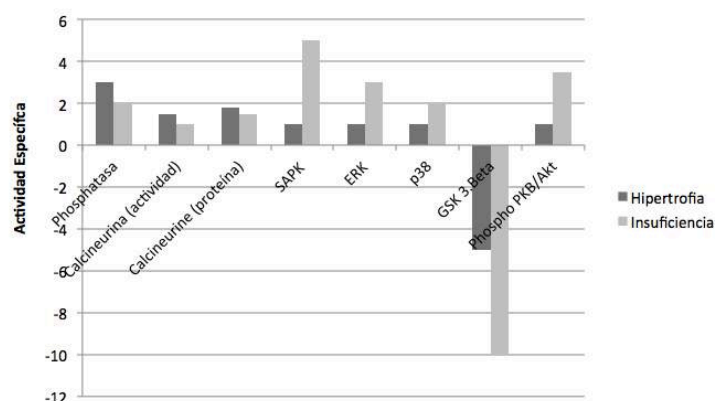
El primer dato interesante es que la hipertrofia patológica activa muy poco a estas tres vías de cinasas (MAPK, p38 y SAPK), mientras que en insuficiencia cardiaca las tres vías aumentan su actividad de 2 a 5 veces (Fig 8).

Por su parte, la vía de calcineurina, se comportó de modo contrario: está más activa en hipertrofia patológica y menos activa en insuficiencia. De hecho, la vía de calcineurina parece ser la única vía activa en la respuesta hipertrófica compensatoria (Haq 2001).

La vía Akt está mucho menos estudiada en corazón, no se activa en hipertrofia, pero se dispara en insuficiencia, aunque Haq propone que sea como efecto anti-apoptótico: “La activación de Akt y la consecuente inhibición de GSK-3 puede proteger células de apoptosis”.

## Vías de Señalización

### Hipertrofia vs. Insuficiencia Cardiaca



**Figura 8. Hiperactivación de genes de vías de señales en hipertrofia e insuficiencia cardiaca.** Especialmente llamativo es el importante incremento de las tres vías de cinasas: SAPK, ERK y p38 en insuficiencia cardiaca (Haq 2001).<sup>7</sup> La excepción es la Calcineurina, que se activa en hipertrofia y es menos activa en insuficiencia, en sus tres actividades: fosfatasa, actividad de Cn y concentración de proteína.

Otro factor importante en las vías de cinasas (proteínas que se activan y desactivan por fosforilación) es el tipo de fosforilación activada. Hornberg (2005), en base a modelos computacionales de las vías de señales, ha propuesto tres factores centrales en la fosforilación de ERK, de las que dependen su función: amplitud, duración y respuesta integrada. La *amplitud* se definen como el máximo porcentaje de ERK fosforilado que se puede alcanzar. *Duración* se define como el tiempo total por el que ERK-PP excede 10% su amplitud. La *respuesta integrada* la definieron como la integración en el tiempo donde ERK está activado entre 0 y 100 minutos. Hornberg propone que dependiendo del tipo de respuesta que tenga una cinasa (en amplitud, duración de la señal y la respuesta integrada), la respuesta celular será diferente, aun cuando el estímulo llegue por el mismo mensajero intermediario. El detalle es crítico y por ejemplo, el tiempo de activación sería el punto determinante para decidir entre la división celular y la diferenciación (Hornberg 2005).

## 5. AVANCES EN TERAPIA MOLECULAR CARDIACA

Una posibilidad importante de nuestro trabajo, es que se utilice en terapia génica. A continuación haremos una breve revisión de los avances en terapia génica cardiaca que nos dará una orientación de su posible utilidad. Los ejemplos de terapia con moderadores de estas vías en corazón son alentadores: por ejemplo, los fármacos más ampliamente utilizado para insuficiencia cardiaca son los inhibidores de la AT-II como el candesartan.

**Efecto del Imatinib.** Este inhibidor de tirosín-cinasas es un buen ejemplo de éxito terapéutico a nivel de vías de señales en la terapia de oncogenes. Este medicamento, se utiliza para leucemia mielógena crónica, inhibiendo la proteína BCR-ABL en pacientes con cromosoma Philadelphia, logrando un incremento de la supervivencia a cinco años: del 31%, antes del imatinib en 1993, hasta 59% con su

<sup>7</sup> Esta gráfica, es un resumen realizado en base al trabajo de Haq 2001. En ese artículo se muestran los resultados de cada marcador de manera independiente, al reunirlos en esta gráfica se observan diferencias interesantes entre hipertrofia patológica e insuficiencia cardiaca.

aplicación en 2009 (Pray 2008) y se está probando para la inhibición de la fosforilación de EGFR en el caso de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Antonicelli 2013). Será interesante probarlo en HC.

**Terapia génica con factores extracelulares.** Se ha probado terapia génica para infarto al miocardio con dos factores extracelulares que tienen buenas perspectivas para medicina translacional, como son el Stem Cell Factor (SCF) o el factor de crecimiento hepático (HGF), el tratamiento experimental de infarto al miocardio con adenovirus con SCF (Yaniz-Galende 2011)<sup>8</sup> mejora la recuperación del infarto a varios niveles:

Incrementó la fracción de eyección en un 12% contra los controles, aumentó el trabajo sistólico global de 55.5 contra 35.6 en controles. El mecanismo de acción propuesto es a través del reclutamiento de células c-kit (+) –que es el receptor celular de SCF–. Estas son células madre que incrementan la vascularización tisular, que puede ser la causa la mejoría cardíaca. C-kit, a su vez, es un receptor tirosín-cinasa, y envía su señal a través del gen Ras causando en este caso angiogénesis. Esta terapia génica ya fue escalada al modelo porcino, que también mostró una importante mejoría, por lo que tiene buenas posibilidades de aplicarse en humano (Ishikawa 2015).

También se ha probado el HGF que mejora la función cardíaca post-infarto. El HGF se une a su receptor celular c-Met, también tirosín-cinasa, es angiogénico y actúa a través de Ras.

Concluimos mencionando que el SCF y la HGF por ser factores extra-celulares, se facilita su transferencia y su utilización en terapia génica parece más sencilla que el gen Ras, el cual debe actuar a nivel intracelular.

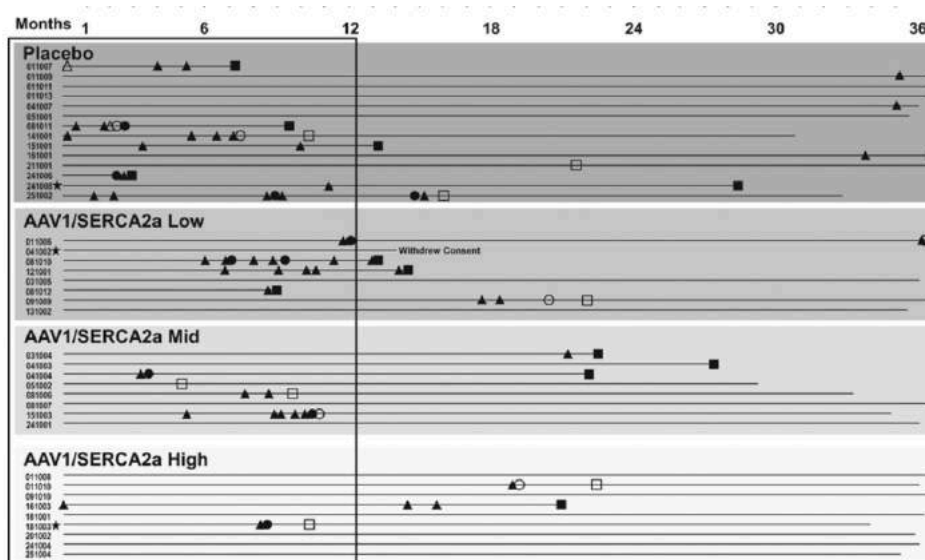
**Terapia génica con genes de función cardíaca.** Algunos genes, que no pertenecen al grupo de oncogenes, tienen más posibilidades de éxito y su experimentación clínica va más avanzada, como el gen SERCA2A (Bomba de calcio de retículo endoplásmico) administrada con virus Adeno-asociado AAV1/SERCA2A en un ensayo clínico fase II. Los pacientes con dosis alta del virus, comparado contra el grupo control mostraron menos eventos letales o graves durante los primeros tres años de seguimiento que el grupo control.

Se probaron tres dosis, la baja fue de: AAV1/SERCA2a ( $6 \times 10^{11}$  DNase-resistant particles [DRP]). La dosis media: ( $3 \times 10^{12}$  DRP) y la dosis alta ( $1 \times 10^{13}$  DRP). Aunque las dosis baja e intermedia no produjeron una diferencia estadísticamente significativa, sí se ve un retraso de eventos, más clara con la dosis intermedia

---

<sup>8</sup> Investigación en la que, por cierto, colaboré de modo directo aunque fui eliminado injustamente como coautor.





WHF ▲ MI △ LVAD ○ Transplant □ Chronic Inotrope ● Death ■ NAb★  
 Note: Clinical events up to and including a terminal event (death, transplant, LVAD) or Month 12, whichever came first, were adjudicated; events thereafter were not adjudicated.

**Figura 10. Beneficio de la transfección de genes SERCA2a en pacientes con insuficiencia.** Se compara la aparición de eventos terminales entre pacientes con placebo contra pacientes con terapia génica con dosis baja, media y alta (*Low, Mid, High*) de SERCA2a. Por evento terminal se entiende muerte, o transplante cardiaco por insuficiencia cardiaca avanzada. (Abreviaturas: **WHF**: Insuficiencia cardiaca total (Whole Heart failure). **MI**: infarto al miocardio. **LVAD**: Left ventricle artificial device).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En la presente sección no pretendemos resumir todos los métodos utilizados, sino sólo detallamos algunos de ellos no reportados en la publicación, o algunos detalles de las principales metodologías usadas en este trabajo. Más detalles de las técnicas se presentan en el artículo base.

**1. Cultivo primario de cardiocitos como modelo de estudio de oncogenes.** El cultivo primario de cardiocitos es una técnica rutinaria, aquí sólo detallamos algunos aspectos de la variante del modelo del cultivo primario de cardiocitos que no cabían en el artículo. Su principal característica es mantener el latido cardiaco durante períodos prolongados, en este caso durante dos semanas, y mostró ser un excelente modelo para estudiar la función de oncogenes. Se logra manteniendo una concentración relativamente alta de suero en el medio.

Para experimentación con genes u hormonas se utiliza una concentración muy baja de suero, 0.1%, para eliminar al máximo factores externos. Regularmente a partir del tercer día de cultivo se de priva de suero, dejando sólo el 0.1% de suero fetal bovino, en lugar de 10% utilizado en todos los cultivos. Con esto se inhibe el latido de cardiocitos, de hecho algunos investigadores para asegurar la completa inhibición de latido y multiplicación de fibroblastos también presentes, añaden aciclo-guanosina al medio. Para nuestra variante de función de genes a largo plazo dejamos suero al 2% con lo cual se mantiene el latido por períodos prolongados, hasta de 2 semanas según nuestra experiencia, pero la concentración no es tan elevada como el 10%.

El cultivo primario de cardiocitos *per se* es excelente modelo para estudiar función de cardiocitos, pues el cambio de fenotipo es inmediato. Por ejemplo, al añadir fenilefrina, incrementan visiblemente su frecuencia de latido y en 24 horas muestran de modo claro líneas Z, como en la figura 2B del trabajo (Ramos-Kuri 2015).

La variante con latido permite observar modificaciones fenotípicas causadas por los oncogenes, como podemos ver en la figura 2A del artículo que Ras-Val12 inhibió latido cardiaco, mientras la DN-Ras lo mejoró, y que corroboramos presencia de líneas Z por DN-Ras (figura 2D, Ramos-Kuri 2015).

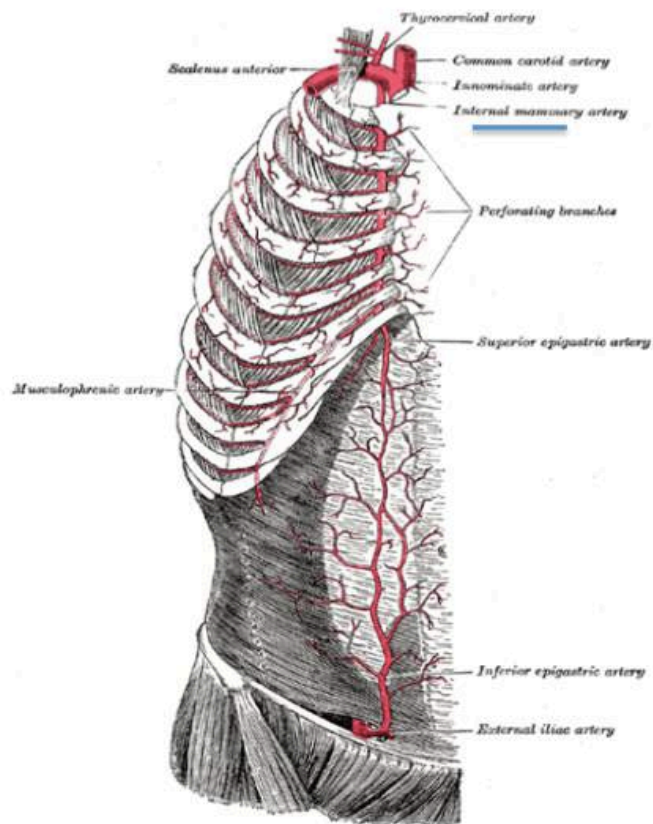
**2.- Cirugía para transferencia de genes por adenovirus.** La cirugía para realizar el bando aórtico y transferencia de genes, requiere un manejo quirúrgico sumamente complejo. Son muchas maniobras con alto riesgo para el semoviente, que requieren alta destreza del cirujano. Aquí daremos detalles de su manejo, y remitimos a los artículos donde se describe a detalle.

Se utilizaron ratas de la raza Sprague Dawley, de 250 a 300 gramos de peso (aproximadamente 8 semanas de edad), se anestesiaron con inyección intraperitoneal de una mezcla de Ketamina (50-100 mg/Kg) y Xylazina (10 mg/Kg); a esta edad y peso los roedores son más resistentes a la cirugía, y manifiestan una hipertrofia pronta.

La rata es intubada y ventilada, primer maniobra compleja, pues aunque a veces es meramente rutinaria otras se dificulta mucho lograrlo. Para intubar al roedor se utiliza un angiocatéter del número 16, al que se recorta la punta filosa y se le da una ligera curvatura. Esta cánula modificada se utiliza como intubador endo-traqueal, cuando se logra la intubación traqueal se elimina el alma de acero y se deja sólo la cánula de plástico. Cuando el roedor está bien ventilado y fijo a la tabla, en decúbito dorsal, se procede a la cirugía.

Se accede al corazón desde cara anterior de tórax, realizando una incisión al borde del esternón primero en piel, seguido en músculos torácicos (pectoral mayor y menor), y posteriormente corte de costillas a nivel de cartílagos costales. El corte de estos debe ser lo más cercano posible al esternón,

debido ya que la arteria mamaria interna pasa un poco más lateral, pero sólo una fracción de milímetro del esternón. En caso de no realizarse de manera cuidadosa, no es raro cortar esta arteria que las más de las veces, resulta fatal.



**Figura 11. Esquema de la Arteria mamaria o torácica interna.** Nótese como corre ligeramente despegada al esternón. La figura es de humano pero la anatomía de esta arteria es prácticamente igual en roedor.

Se cortan 5ª, 4ª y 3ª costilla, a veces se puede cortar hasta la 2ª costilla sobretodo cuando se hará la doble maniobra (bandeo aórtico y transferencia de genes). Con un separador de tórax se amplía el campo, con lo que se ve claramente el corazón, y se procede a realizar las maniobras requeridas.

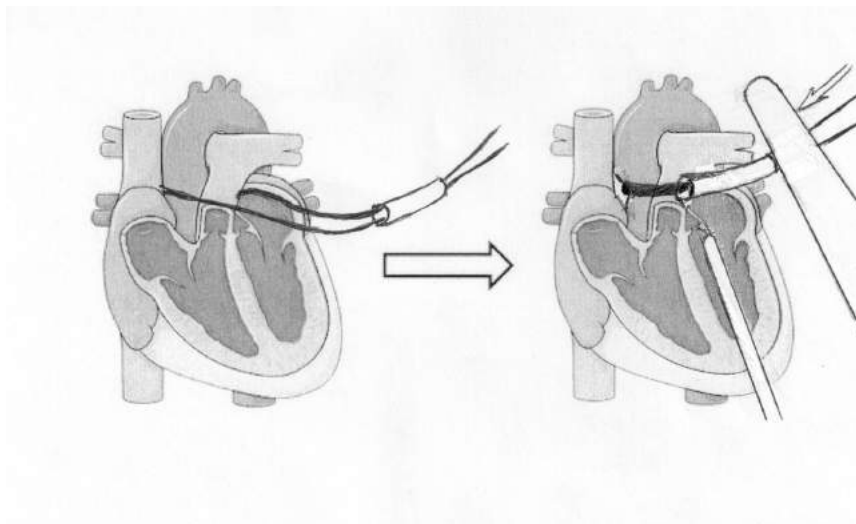
### 3.- Transferencia cardiaca de genes. Para su análisis lo dividimos en los siguientes pasos:

- a) Se pasa un hilo quirúrgico cero, esto es grueso, para que no sea cortante, por detrás de ambas arterias pulmonar y aorta.
- b) Se coloca un pequeño tubo que una ambos extremos del cáñamo (fig. 12). Se deja listo para presionar en el paso 'h'.
- c) La suspensión viral se atempera justo antes de inyectarse en una incubadora a 37 °C por pocos minutos a fin de activar al virus.
- d) Se toman 200 µl del lote viral, de  $\sim 5 \times 10^{11}$  UFP/ml, que corresponden a  $10^{10}$  UFP totales y se colocan en una jeringa de insulina, mezclados con una proporción igual de PBS, o solución salina isotónica (0.9%) y adenosina; se colocan en la jeringa de insulina.
- e) Se toma un catéter pediátrico, de punta fina que tiene un alma de aguja hipodérmica, y una camisa de catéter plástico.
- f) Se coloca la punta del catéter en la base de la aorta, esto se logra inyectando el catéter desde el ápex cardiaco hasta la base de la arteria aorta.

- g) Se elimina el alma de acero del catéter y se deja la cánula, la cual se conecta a la jeringa de insulina con el virus, pero aún no se inyecta.
- h) Se bloquea la salida sanguínea de ambas arterias, presionando firmemente el tubo que está fuera del hilo (Fig. 12 B).
- i) En este momento se inyecta el virus.
- j) Se mantiene bloqueada la circulación durante 30 segundos, a fin de que el virus circule por arterias coronarias y llegue a tejido cardíaco.
- k) La adenosina inhibe por competencia y momentáneamente, la función del ATP, disminuyendo de manera importante el latido cardíaco, y evita daño en este tejido. La adenosina también tiene efecto vasodilatador, facilitando así la llegada del adenovirus a tejido muscular cardíaco.
- l) El blanqueo del corazón muestra la entrada de la solución viral inyectada y su retención.
- m) Al pasar los treinta segundos se retiran el catéter y el bloqueo arterial, de manera casi inmediata se recupera el latido cardíaco.

**A**

**B**

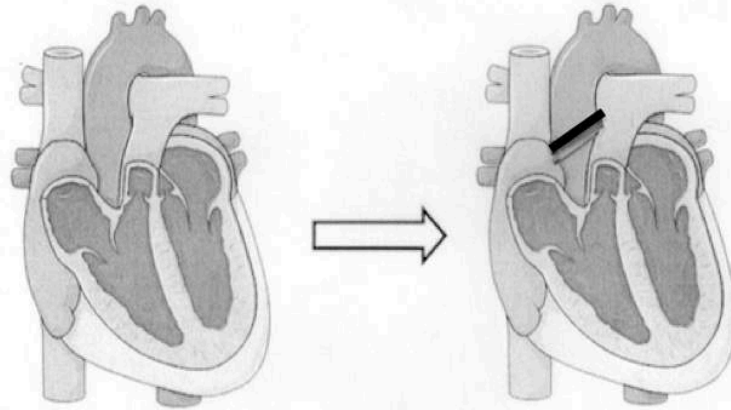


**Figura 12. Esquema de la transferencia de adenovirus con el gen.** Se realiza por medio de las siguientes maniobras: bloqueo simultáneo de arterias pulmonar y aorta, junto con inyección del adenovirus en la base de la aorta. Nótese cómo dirigiendo la punta de la cánula desde el ápex a la base de la aorta se está en ventrículo izquierdo y en la entrada de la aorta.

**4.- Bando aórtico.** Esta maniobra es también muy compleja, regularmente se hace después de la transferencia del virus. Requiere los siguientes pasos:

- a) Identificación de arterias aorta y pulmonar.
- b) Separación de arteria aorta y arteria pulmonar, que están unidas por el ligamento inter-arterial. Por medio de unas pinzas curvas pequeñas: se introducen entre ambas arterias, se cierran y abren hasta que las puntas de las pinzas rompen el ligamento y pasan libremente por atrás de la aorta y entre ambas arterias.
- c) El paso b es el más difícil, debe realizarse con todo cuidado pues la arteria pulmonar es muy delgada y frágil, la ruptura de esta arteria es un evento siempre fatal.
- d) Una vez eliminado este ligamento se puede colocar el clip de tantalio alrededor de la arteria aorta.
- e) Se coloca una cánula intra-torácica, que se aplica desde el exterior del tórax, para la última maniobra quirúrgica .

- f) Se cierra por planos.
- g) Se aspira con la cánula para eliminar sangre y aire en espacio pleural y facilitar la formación de presión negativa intrapleural, acelerando así la recuperación de la función pulmonar en el período postquirúrgico.
- h) Se mantiene el respirador hasta la completa recuperación de anestesia del animal en experimentación, regularmente tarda entre 5 y 20 minutos.



**Figura 13. Bando o constricción aórtica.** Incrementa la presión intracardiaca y causa hipertrofia ventricular izquierda. Se muestran dos posibles localizaciones: en la base o en cayado de la aorta, (entre tronco braquiocefálico derecho y carótida izquierda), también se puede colocar en aorta descendente. Para nuestro ensayo utilizamos siempre la basal.



**Figura 14. Fotografía de una cirugía en rata.** Ventana pequeña, donde se distingue la arteria aorta y el clip que la obstruye. Así es la visión del campo durante la cirugía, hemos dejado el tamaño aproximado en vida real a fin de mostrar lo difícil de la técnica.

La realización de ambas maniobras (bando aórtico y transferencia de genes) en la misma cirugía incrementa la mortandad, pues cada maniobra es compleja *per se*, pero sería más difícil y con mayor mortandad hacer dos cirugías mayores al mismo roedor. El buen manejo de ambas maniobras da un resultado exitoso, en general sobreviven entre 70 y 80% de los roedores. Los nuevos vectores virales, en especial los virus adeno-asociados, permiten administrar los virus de modo intravenoso, teniendo como blanco el tejido cardiaco, que sí facilitan el experimento, pero no se utilizó en el presente trabajo.

Una semana después del bando aórtico ya se presenta HC, y dos semanas después alcanza una hipertrofia más significativa, cercano al máximo de hipertrofia. Estas dos semanas coinciden con la ventana de mayor expresión de los genes transferidos con Adenovirus, por lo que el modelo utilizado es válido. Si se mantienen los animales con esta constricción aórtica, se produce insuficiencia cardiaca en cuatro a seis meses después.

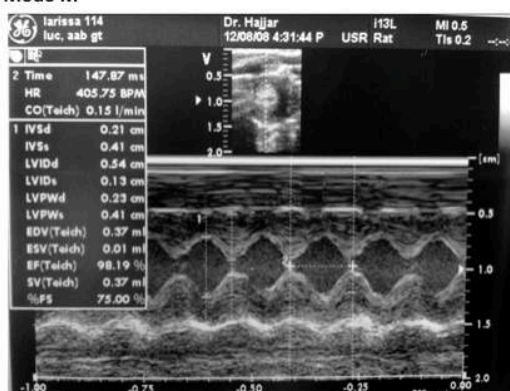
**5. Mediciones por Ecocardiografía.** El seguimiento de la remodelación cardiaca se realiza por ecocardiografía. Se realiza una basal, una a la semana y la última 14 días post-cirugía, antes del

sacrificio. Se mantiene a los roedores bajo sedación con Ketamina (60 mg/kg, intraperitoneal), al momento de la ecografía se busca mantener una frecuencia cardiaca alrededor de 400 latidos por minuto, ajustando la sedación de ketamina. Las vistas del eje corto del corazón se obtuvieron usando la sonda 14 MHz GE-i1 3L. Las imágenes bidimensionales en el modo M se tomaron en el punto medio de los músculos papilares del ventrículo izquierdo. La posición del transductor se ajusta con cuidado hasta que la imagen del eje corto de la cavidad del ventrículo izquierdo aparece circular, indicando intersección perpendicular al eje longitudinal del VI. Se midieron las dimensiones de la cavidad y pared ventricular izquierda en sístole y en diástole con el modo M de ecocardiografía. Con ésta se determinó:

- i) la fracción de acortamiento (porcentaje de diámetro ventricular acortado en sístole),
- ii) El diámetro final diastólico de VI
- iii) El diámetro sistólico final

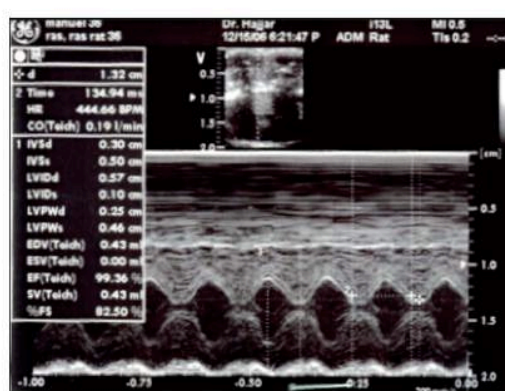
### Ecocardiografía basal

Modo M

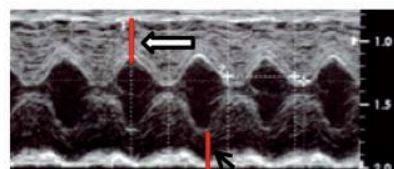
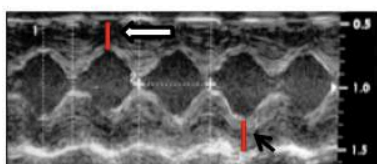


### Ecocardiografía segunda semana

Modo M



### Acercamiento



**Figura15. Ejemplos de ecocardiografía basal y dos semanas post-bandeo aórtico.** El acercamiento muestra el engrosamiento de las paredes: IVSd (Interventricular septum in diástole) (flecha blanca) y la LVPWd (Left Ventricle Posterior Wall in diástole) (flecha negra).

	Basal	2ª semana
IVSd	0.21 cm	0.30 cm
LVPWd	0.19 cm	0.25 cm
%FS	82.86	82.5
LVIDd	0.50 cm	0.57 cm

**Tabla II. Cambios en ecocardiografía por hipertrofia.** Ejemplo de valores de ecocardiografía basal y a las dos semanas después del bandeado aórtico. Es claro el engrosamiento de pared ventricular observados en cara anterior (IVS) como posterior (LVPW) de ventrículo izquierdo. La comparación se realiza en diástole, que es el momento en que se ve claramente el grosor de la pared. Abreviaturas:

**IVSd:** Septum interventricular en diástole  
**LVPWd:** Pared ventricular posterior de VI en diástole  
**%FS:** Fracción de eyección: % de acortamiento de VI entre diástole y sístole  
**LVIDd:** Diámetro interno de VI en diástole

**6. Efecto de la variante silvestre de H-Ras.** Para este estudio analizado sólo en la tesis, seguimos la metodología como lo reportado en el artículo. Se realizó la cirugía para crear el corazón con hipertrofia por sobrecarga, con la administración simultánea de  $\approx 10^{10}$  UFPs de adenovirus, con la variante silvestre de Ras, se realizaron ecocardiografías basales, una semana después y a la segunda semana previo a su sacrificio, seguido por peso del corazón, toma de muestra para mRNA y proteínas, e inclusión en Tissue Tek para realización de estudios histológicos.

**7. RT-PCR.** La expresión de marcadores de hipertrofia cardíaca en el corazón de los roedores transferidos con la variante de Ras, lo analizamos con esta técnica. Se analizaron los tres principales marcadores: cadena pesada de miosina beta ( $\beta$ -MHC), cadena pesada de miosina alfa ( $\alpha$ -MHC) y factor natriurético atrial (ANF). Estas tres proteínas se elevan en la hipertrofia patológica. Finalmente no se reportó el valor de la  $\alpha$ -MHC, porque encontramos que los primers utilizados se unían en varios puntos del ADN, además del gen propio, por lo que el valor podría ser impreciso. Aunque vale la pena comentar que mostraba muy buenos resultados, por lo que lo analizamos en la tesis. El RT-PCR se utiliza para expresión y regulación de genes, como era nuestro caso.

La graficación de los resultados de RT-PCR se pueden realizar de manera automática, por el software del mismo equipo, o por medio del cálculo directo. Nosotros lo hicimos de manera directa, utilizando el tutorial de Bio Rad: <https://.youtube.com/watch?v=GQOnX1-SUurl> (consultado el 30 de septiembre de 2015).

El dato clave es la cuantificación relativa, analizando con valores logarítmicos base 2, la diferencia de expresión: ¿cuántas veces más se expresa con relación a un marcador basal, de genes *housekeeping*, y al experimental control negativo?. Los pasos para lograrlo son:

- 1.- Los valores se normalizan contra el marcador basal: actina o mRNA 18S.
- 2.- Esto nos arroja el primer valor o  $\Delta Ct$ .
- 3.- Se resta el  $\Delta Ct$  experimental menos el  $\Delta Ct$  del control basal (Sham).
- 4.- Esto nos arroja el segundo valor o  $\Delta\Delta Ct$  que es el valor a elevar la base

Por ejemplo:

		PASO 1	$\Delta Ct$ – Normaliz.	PASO 2
	Ct	Normalización vs. actina	$\Delta Ct$ N - $\Delta Ct$ Ctrl = $\Delta Ct$ experiment	$\Delta Ct$ promedio
<b>Sham</b>	16.10	16.7	- 0.6	+ 1.2
	18.35	16.5	+ 1.8	
<b>AoB-Beta</b>	12.30	14.3	- 2.0	- 1.1
	17.90	18.1	- 0.2	
<b>AoB-DNRas</b>	13.6	15.2	- 1.6	0
	17.8	16.2	+ 1.6	

**PASO 3. Obtención del  $\Delta\Delta Ct$ :  $\Delta Ct$  experimental -  $\Delta Ct$  Sham =  $\Delta\Delta Ct$**

	$\Delta Ct$ experimental	$\Delta Ct$ Sham	=	$\Delta\Delta Ct$	
Sham	+ 1.2	- (+ 1.2)	0	$2^{(0)}$	<b>1</b>
AoB-Beta	- 1.1	- (+ 1.2)	-2.2	$2^{-(-2.2)} = 2^{(2.2)}$	<b>4.92</b>
AoB-DNRas	0	- (+ 1.2)	-1.2	$2^{-(-1.2)} = 2^{(1.2)}$	<b>2.3</b>

Podemos resumir algebraicamente en los siguientes tres pasos:

**Paso 1. Normalización vs. *gen housekeeping***

Valor experimental (-) valor del gene *housekeeping* =  $\Delta Ct$  experimental

Valor experimental sham (-) valor gene *housekeeping* =  $\Delta Ct$  sham

**Paso 2. Obtención del  $\Delta Ct$  promedio:**

$(\Delta Ct$  experimental A +  $\Delta Ct$  experimental B +  $\Delta Ct$  experimental N) / N =  $\Delta Ct$  Promedio

**Paso 3.  $\Delta\Delta Ct$ :**

$\Delta Ct$  Promedio (-)  $\Delta Ct$  promedio sham =  $\Delta\Delta Ct$

Tabla IV. Análisis de RT-PCR.

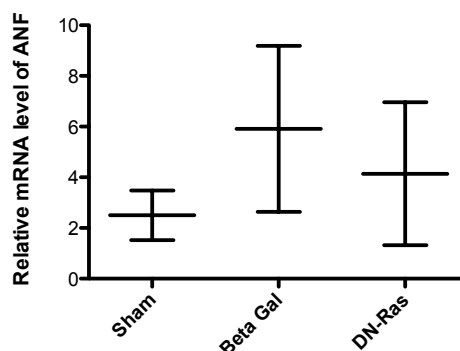


Figura 16. Ejemplo de análisis gráfico final del RTPCR Los niveles de ANF son similares ¿?? Análisis gráfico final de RT-PCR, entre tres grupos. Nivel de mRNA relativo del ejemplo anterior. Esta fue una de las primeras corridas y se utilizaron los niveles de mRNA de actina para normalizar los valores.

La  $\Delta\Delta Ct$  final del ejemplo muestra que mientras que el control positivo (hipertrofia simple, AoB-Beta) incrementó la expresión de ANF, la DN-Ras disminuyó su expresión a 2.3 veces, que es un valor más cercano a hipertrofia fisiológica. Pero es tan solo un ejemplo para comprender la lógica del método. Para esta primera corrida se utilizó actina como valor de referencia, después se cambió por mRNA 18S que es más preciso para ensayos cardiacos.

**8.- Análisis del tamaño de cardiocitos con aglutinina de germen de trigo**

Esta prueba es especialmente útil para calcular el tamaño de cardiocitos *in vivo*, pues en los cortes histológicos de tejido cardiaco teñidos con H y E no es fácil determinar la membrana celular, a diferencia de esta técnica con aglutinina que no deja lugar a dudas.

- *Preparación de tejido.* El fragmento del corazón recién obtenido, de la región media a nivel de músculos papilares hacia el ápex, se incluye en *Tissue Tek*, y se crio conserva en



ultracongelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se realizan cortes histológicos de 8 micras en criotomo, para la prueba de aglutinina es importante que sean cortes así delgados, a fin de tener un solo nivel de células.

- **Materiales:** Buffer de fosfato salina (PBS), pH 7.4, solución balanceada de Hank's (HBSS) sin rojo fenol, 0.2% Triton® X-100 en PBS, agua des-ionizada, ProLong® Gold reactivo anti-blanqueo si se desea. Se prepara una solución de aglutinina de germen de trigo (WGA), a una concentración de 1.0 mg/ml, disolver 5.0 mg de WGA conjugado liofilizado en 5 ml de PBS o agua. Se puede almacenar la solución stock a  $-20^{\circ}\text{C}$  por al menos un mes. Para almacenamiento a corto plazo, añada azida de sodio, a una concentración final de 2mM, y almacenar a  $2-6^{\circ}\text{C}$ . Proteja de la luz y evite procesos repetidos de congelamiento-descongelamiento. El protocolo final es sencillo:
- **Solución de tinción.** Diluya el conjugado de la solución stock WGA de 1.0mg/ml en HBSS. Se recomienda comenzar con concentraciones de  $5\mu\text{g/ml}$  para los conjugados de WGA. No se recomienda utilizar el medio de cultivo celular para diluir los conjugados de WGA porque pueden incrementar la señal de *back-ground*.
- **Tinción de células.** Aplicar suficiente cantidad de solución marcadora para cubrir las células adherentes al porta o cubre-objetos. Incubar por 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .
- **Lavado de células.** Cuando el tiempo de tinción está completo, se remueve la solución de tinción, y se lavan las células dos veces en PBS. En este caso las células ya están fijadas al portaobjetos.
- **Fijación opcional de células.** Pueden fijarse las células teñidas con 4% de formaldehído por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguido por lavados en buffer y alguna otra contra-tinción. También puede permeabilizar las células con 0.2% Tritón X-100 (pero considerando que la tinción es extracelular, no es necesario).
- **Análisis del tamaño celular.** Las tejidos se observan en microscopio de fluorescencia, se toman fotografías de zonas correspondientes, a fin de que sean comparativas las células analizadas: de preferencia cardiocitos del tejido papilar donde tienen una distribución perpendicular al corte, como en la figura 5D del artículo. El perímetro celular se analiza con algún programa de análisis de imágenes como Image J ó Photoshop.

## RESULTADOS

### I. ARTÍCULO PUBLICADO

#### Título

***Dominant negative Ras (DN Ras) attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy.***

#### Autores

Ramos-Kuri, Manuel; Kleopatra Rapti, Hind Mehel, Shihong Zhang, Perundurai S. Dhandapany, Lifan Liang, Alejandro García-Carrancá, Regis Bobe, Rodolphe Fischmeister, Serge Adnot, Djamel Lebeche, Roger J. Hajjar, Larissa Lipskaia y Elie R. Chemaly.

#### Revista

*Biochemica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2015.1853: 2870-2884

#### Traducción del resumen del artículo base

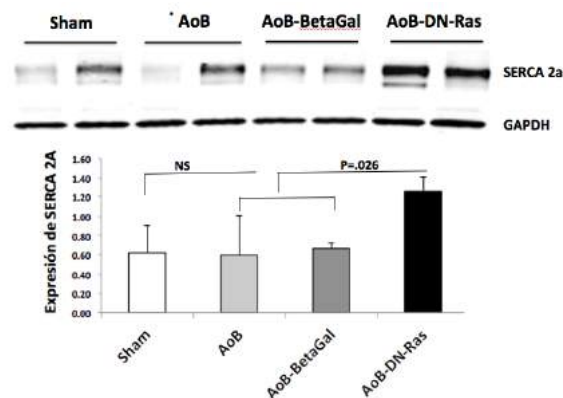
La importancia del oncogen Ras en hipertrofia cardíaca es bien conocida. Los efectos hipertrofiantes de la mutante activa de Ras-Val12 se revelan tanto por síndromes clínicos debidos a mutaciones de Ras, como a estudios experimentales. En este trabajo examinamos el posible efecto anti-hipertrofiante de la inhibición de Ras in vitro utilizando cardiomiocitos neonatales de rata (NRCM), e in vivo por medio del modelo de sobrecarga ventricular izquierda (SV) en rata. La función de Ras fue modulada por medio de la transferencia de genes con un vector adenoviral, de la mutante activa de H-Ras- (Ras-Val12) o su dominante negativa (DN-Ras-N17). In vitro, Ras-Val12 activa la expresión de NFAT resultando en un efecto pro-hipertrofico y cardiotoxico tanto en el latido, como en la organización de sarcómeros de los NRCM. En contraste, la DN-Ras tuvo efecto anti-hipertrofico en NRCM, inhibió NFAT y ejerció efecto cardioprotector que se mostraba porque mantiene el latido de los NRCM, y su estructura sarcomérica. Experimentos adicionales con estrategias de silenciamiento del gen H-Ras, corroboraron que el efecto anti-hipertrofico de siRNA-H-Ras en NRCM. In vivo en el modelo de SV, ambas mutantes de Ras se asociaron con hipertrofia similar dos semanas después de la inducción de POH y la transferencia de la mutante Ras. Sin embargo, los diámetros del ventrículo izquierdo fueron mayores y la fracción de eyección de ventrículo izquierdo fue menor en el grupo Ras-Val12 comparado con el control y la DN-Ras. Además, DN-Ras redujo el área de los cardiomiocitos in vivo y disminuyó la expresión de marcadores de hipertrofia cardíaca patológica. Experimentos en cardiomiocitos adultos después de dos semanas de POH y transferencia del gen, la DN-Ras mejoró el acortamiento de sarcómeros y las medidas de calcio transitorio, comparada a Ras-Val12. Sobretudo, la DN-Ras promueve una forma de hipertrofia más fisiológica, sugiriendo un blanco terapéutico interesante para hipertrofia cardíaca patológica.

El artículo completo se reproduce en el anexo de la presente tesis.

## 2. DN-Ras incrementa la expresión de SERCA2a.

Con respecto a la DN-Ras añadimos solamente un ensayo, que es el Western Blot analizando la expresión de SERCA2a. Este resultado es importante, pues sugiere un posible papel de la DN-Ras en insuficiencia cardíaca. No se pudo incluir en el artículo, pues este WB careció del grupo Ras-Val12, pero tiene datos suficientes para concluir la función de Ras en insuficiencia cardíaca.

El WB de la figura 17 muestra que la hipertrofia cardíaca por bandedo aórtico, no incrementa la expresión de SERCA2A (Fig. 17), lo que coincide con lo reportado para hipertrofia fisiológica o patológica (Jenkins 20..., y Fig. 1 de la tesis); pero en cambio, la DN-Ras sí la incrementó (Fig. 17). Este WB demuestra que la DN-Ras incrementa expresión de SERCA2A, lo cual es importante pues es bien sabido que la insuficiencia cardíaca cursa con disminución de expresión de SERCA2a, lo que sugiere que la DN-Ras puede ser útil también para insuficiencia.



**Figura 17.** DN-Ras incrementa expresión de SERCA2a en corazón con sobrecarga. Mientras que la hipertrofia no incrementa la expresión de SERCA 2A (que se observa aquí y en la Fig. 1), ésta se eleva con la sobrecarga junto con la transferencia de DN-Ras. La observación a simple vista sugiere que sí se incrementa su expresión, con significancia estadística de DN-Ras vs. ambos grupos de AoB alcanza una  $p=0.026$ .

**GAPDH.** (Gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa), control de carga de proteínas en el gel.

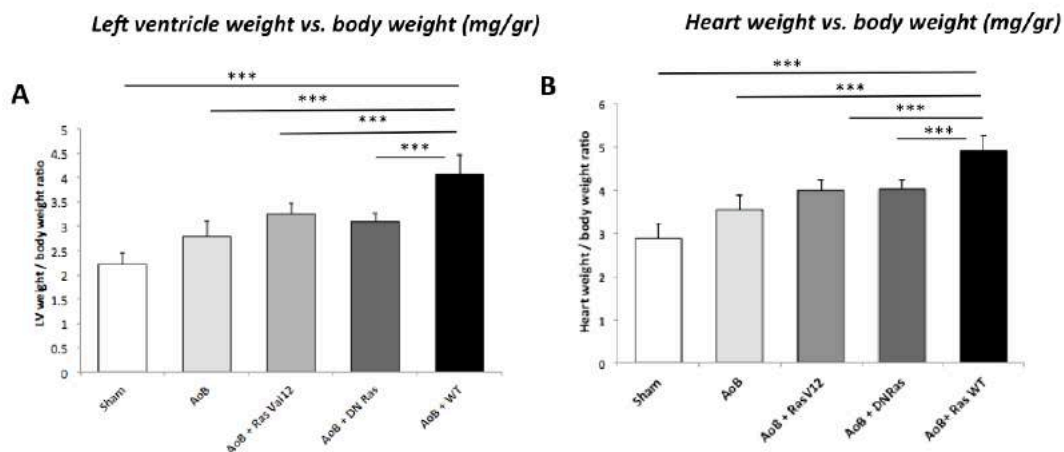
## 3. Remodelación de hipertrofia por la variante silvestre de Ras

Aunque en las tesis del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en la sección de resultados usualmente se suelen detallar algunas características del artículo original, en la presente preferimos describir algunos resultados extra al artículo central de la tesis, resultados aún no reportados, y que pueden ser base para otro trabajo en torno al papel de H-Ras en corazón. Básicamente mostramos los ensayos *in vivo* con la variante WT-RAS, en el modelo de hipertrofia por sobrecarga ventricular izquierda.

Los resultados son muy sugestivos: la variante WT-Ras produce una mayor hipertrofia, que aquí llamaremos *sobre-hipertrofia*, aunque aún no podemos definir claramente el tipo de hipertrofia producida. Aunque algunos datos anatómicos sugieren una mejora funcional cardíaca, otros sugieren que puede ser de tipo patológico, según analizaremos a continuación. Aún se requieren otros ensayos para lograr concluir este trabajo.

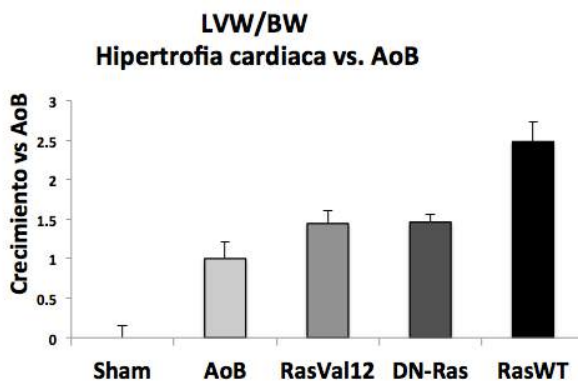
**Análisis morfológico.** Los corazones con bandeado aórtico transferidos con la WT-Ras (AoB + WT-Ras) mostraron importantes diferencias que los otros tres grupos, los que en este caso, funcionan como controles positivos: (AoB), (AoB + DN-Ras) o (AoB + Ras-Val12).

**3.1. Ras-WT causa sobre-hipertrofia.** El primer dato que salta a la vista, es la hipertrofia claramente mayor de los corazones con bandeado aórtico (+) Ras-WT, y que se observa tanto en el análisis del peso de ventrículo izquierdo contra el peso corporal (LVW/BW), como en el análisis del peso total del corazón (HW/BW) (Fig. 18), la diferencia tiene incluso una alta significancia estadística, con una  $p > 0.001$ .



**Figura 18 A y B. La WT Ras casusa mayor hipertrofia.** La variante normal de Ras causa una hipertrofia mucho mayor que el control positivo con sólo sobrecarga ventricular, que se analiza en la Fig. 18C.

**Valores estadísticos.** \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . \*\*\*  $p < 0.001$ . (NS): no significativa.



**Figura 18.C.** Si consideramos que la diferencia entre el control negativo (sham) y el AoB es de 0.74mm, y esta diferencia la tomamos como unidad de hipertrofia, y comparamos el crecimiento de los otros grupos de corazones contra esta unidad, observamos que la hipertrofia de RasVal12 o DN-Ras es muy similar entre ellos y de 1.4:1 contra la hipertrofia control, mientras que Ras WT tiene una proporción de 2.5:1.

Como comentamos al pie de figura 18.B, la diferencial entre el control negativo (sham) y el AoB aumenta el tamaño del corazón en proporción de uno, y al comparar este valor con el crecimiento de RasWT se trata de un crecimiento 2.5 : 1, esto es un crecimiento 250% mayor que la hipertrofia del control positivo. Esto nos habla de que Ras-WT causa un crecimiento enorme del corazón que es lo que en esta tesis llamamos sobre-hipertrofia. Por otro lado, llama la atención de que a pesar de ser un corazón tan grande, el diámetro interino esté dentro de los límites del control positivo de hipertrofia (Fig. 20), lo que nos habla de un corazón muy grande con buena contractilidad, pues si no tendría un diámetro interno mucho mayor.

Sin embargo, cabe aclarar que una primera causa a descartar de esta sobre-hipertrofia es un posible error del modelo. Al analizar los resultados, el Dr. Elie Chemally (coordinador del trabajo) observó que la *dimensión basal de los corazones transferidos con la Ras-WT*, eran mayores que los corazones de

animales controles o los de animales transferidos con las otras mutantes. Esta objeción se analiza en las figuras 23 y 24, aunque ese análisis sugiere que la dimensión final del corazón no depende de su dimensión basal.

**3.2. Grosor de pared ventricular.** La comparación del ancho de pared ventricular muestra que contrario a la mutante Ras-Val12, la variante silvestre causa un engrosamiento de pared ventricular, según muestra el análisis por ecocardiografía (Fig. 19 A y B). La comparación del ancho de pared ventricular de la WT-Ras comparado contra el control positivo con AoB, cuando se analiza de manera independiente, no da significancia estadística (Fig. 19 A y B), también alcanza validez al analizar ambas en conjunto.

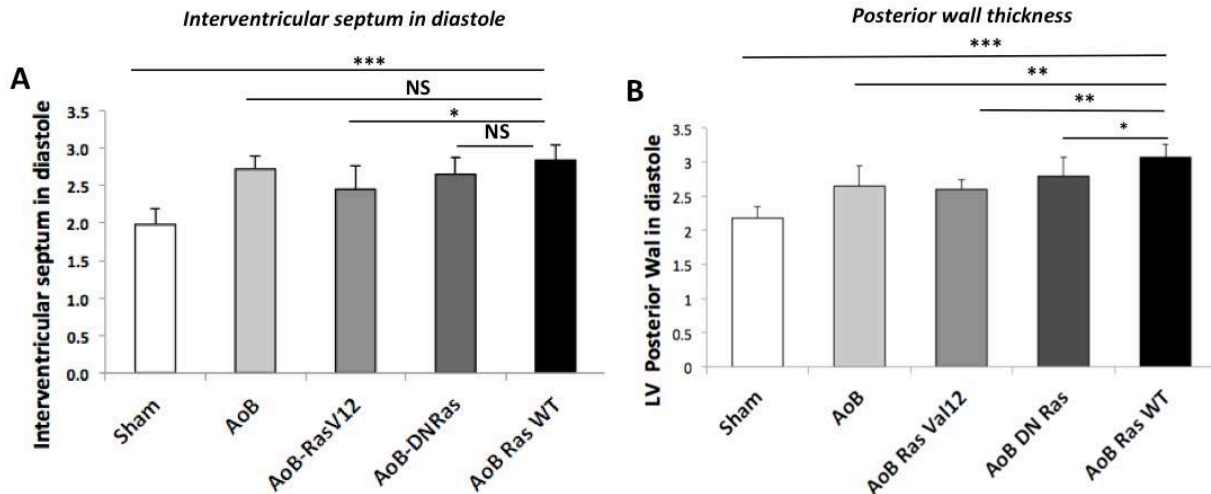


Figura 19 (A, B). Aumento de grosor de pared ventricular izquierda en corazones con sobrecarga (+) WT-Ras. Además de causar una sobre-hipertrofia, la WT-Ras aumenta el grosor de pared ventricular izquierda. (\*:  $p < 0.05$ . \*\*:  $p < 0.01$ . \*\*\*:  $p < 0.001$ . NS: no significativa).

**3.3. Diámetro interno de Ventrículo izquierdo con WT-Ras.** El análisis del diámetro ventricular diastólico por ecocardiografía no muestra diferencia importante entre los controles positivos y WT. En el diámetro sistólico casi alcanza validez contra el AoB ( $p = 0.0528$ ).

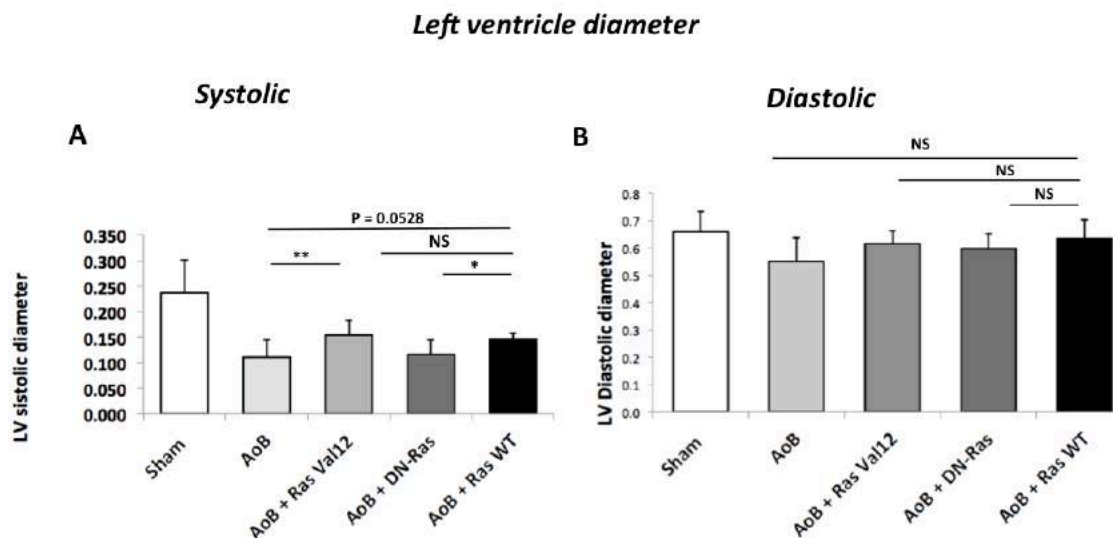
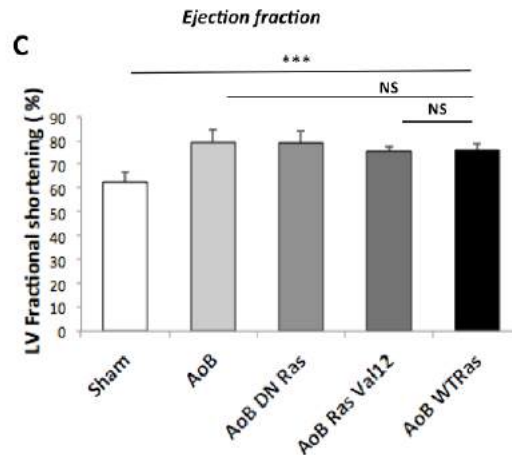


Figura 20 (A y B). Diámetro sistólico y diastólico de ventrículo izquierdo. Similar a lo observado en el AoB + Ras Val12, Ras-WT. El análisis más importante en cuanto a este diámetro del ventrículo, es el mostrado en la figura 20C, que corresponde a la fracción de eyección, que se obtiene con base en estos datos.

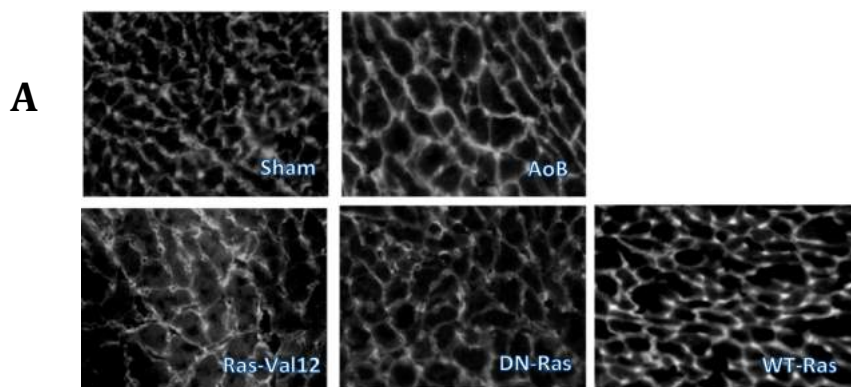


**Figura 20 (C). Ras WT disminuye la fracción de eyección de ventrículo izquierdo (FS, LV Fractional shortening).** RasWT, al igual que RasVal12, disminuyen el FS de VI. En esta gráfica hemos colocado RasVal12 y RasWT juntos para resaltar esa disminución de FS en ambos casos; aunque sólo alcanza validez estadística la comparación contra el control negativo, sin sobrecarga ventricular (sham).

**3.4. Modificaciones fisiológicas por WT-Ras.** Al comparar las dimensiones del corazón por ecocardiografía, tanto en la figura 20 A y B, donde se ve el diámetro interno del VI, como en la figura 20C (fracción de eyección) de WT-Ras se observan pocas diferencias entre la WT-Ras y los otros grupos de hipertrofia. Pero si consideramos que la WT-Ras produjo unos corazones sumamente grandes, Fig. 18A - 18C, uno esperaría que las dimensiones internas fueran mayores. Así aunque varios datos apuntan a que esta es una hipertrofia patológica, hay dos datos que sugieren mejoría fisiológica: el mayor grosor de la pared ventricular (Fig 19B) y el diámetro interno relativamente normal de Ras-WT (Fig. 20).

**3.5. Análisis histológico: tamaño de cardiomiocitos.** El área de los cardiomiocitos transferidos con la WT-Ras, se estudió en cortes histológicos de corazones transferidos con las mutantes de Ras, mostró que a nivel celular la Ras-WT no causa un crecimiento celular mayor que la Ras-Val12 (Fig. 21).

Se requieren ensayos *in vitro* con la WT-Ras, a fin de analizar su efecto en el cardiomiocito: si aumenta o disminuye sarcómeros, si mantiene latido cardíaco como la DN-Ras, (Fig. 2 Ramos-Kuri, 2015) etc.; es información que ayudará a comprender mejor el efecto real de la WT-Ras y sus mecanismos de acción.



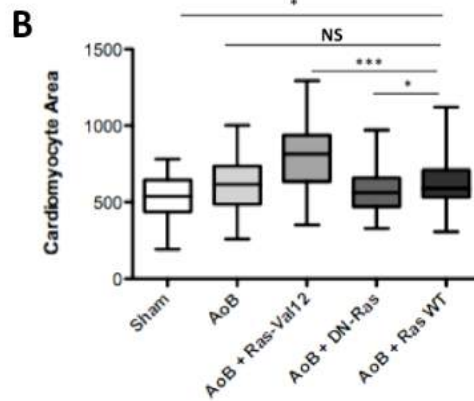


Figura 21. Modificación del área de cardiomiocitos por las mutantes de Ras. **Cortes histológicos de corazón, las fibras miocárdicas están cortadas transversalmente. Se mide su área y se compara entre grupos control (sham y AoB) contra los corazones con las tres variantes de Ras. Pánel A: Tinción con aglutinina. Pánel B: Gráfica de barras representando el promedio del área en estos grupos. (Validez estadística: \*: p< 0.05. \*\*: p< 0.01. \*\*\*: p<0.001. NS: no significativo).**

**3.6. Marcadores de hipertrofia cardiaca, en corazón con AoB transferidos con WT-Ras.** Este ensayo fue clave para tener una buena idea del mecanismo de acción de Ras silvestre. WT-Ras incrementó el nivel de expresión de ANF y Beta-MHC (Fig. 17). Este efecto corrobora que al igual que en Ras-Val12, el incremento de la función de H-Ras aumenta la expresión de estos marcadores de hipertrofia, sin importar si la hipertrofia viene por hiper-funcionalidad de la Ras-Val12 o por la sobre-expresión de Ras-WT.

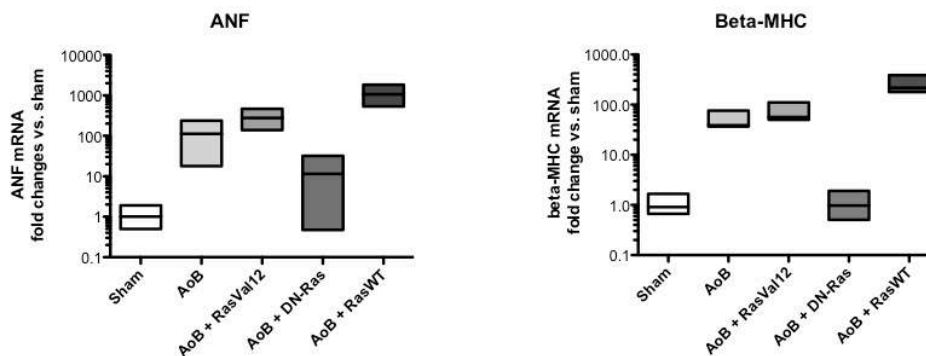
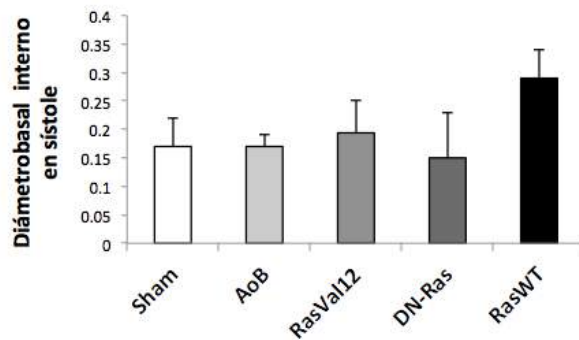


Figura 22. La variante WT-Ras incrementa la expresión de ANF y Beta-MHC. Nótese el alto nivel de expresión de estos dos marcadores activado por Ras-WT. Este dato es contrario a la DN-Ras, y similares a Ras-Val12 (Abreviaturas: ANF: factor natriurético atrial. MHC: cadena pesada de miosina).

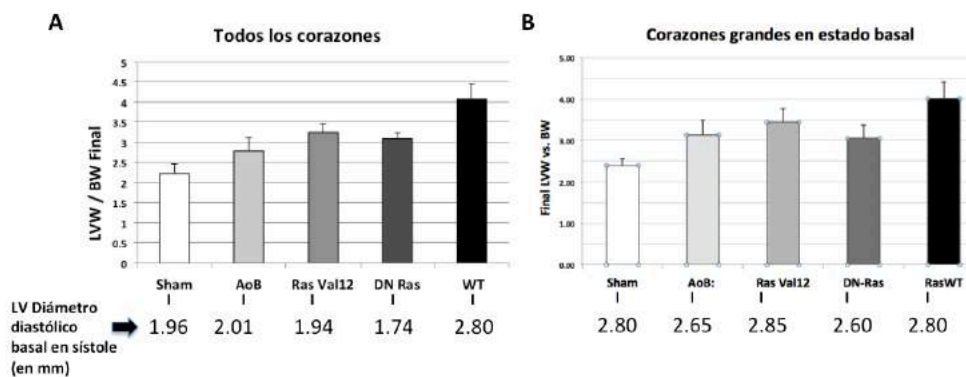
#### 4. Consideraciones sobre el modelo

Una objeción contra los ensayos de la variante normal de Ras, es que una posible causa de esta sobre-hipertrofia sea un error del modelo: al analizar los resultados, el Dr. Elie Chemally (coordinador del trabajo) observó que, *aleatoriamente*, el diámetro basal de los corazones transferidos con la Ras-WT, eran mayores que los de otros grupos controles o experimentales, según se muestra en la Fig. 23



**Figura 23. Diámetro basal mayor de los corazones utilizados para Ras-WT.** Esta gráfica muestra que los corazones utilizados para el grupo de Ras WT eran mayores que los de otros grupos antes del experimento. La figura compara el diámetro interno del ventrículo izquierdo, en sístole, que era mayor en los corazones tratados con Ras-WT. Sobre decir que la diferencia aquí mostrada fue aleatoria. Una primera respuesta a esta objeción se da en la fig 24. **LVIDs:** Diámetro interno del ventrículo izquierdo en sístole

A fin de analizar si la mayor dimensión basal de los corazones fuera la causa de la sobre-hipertrofia, buscamos animales en los otros grupos que también tuvieran aleatoriamente mayor dimensión cardiaca en sus valores basales, según se muestra a continuación



**Figura 24. La hipertrofia final, no depende del tamaño inicial de corazones.** Comparación del tamaño final de los corazones, entre aquellos que de manera aleatoria eran inicialmente de diámetro basal grande (B) en todos los grupos, contra todos los corazones (A) (esta figura 24A corresponde a la 18A de la tesis). Nótese como al comparar A con B, las dimensiones finales en todos los grupos son muy similares: Esto sugiere de modo casi concluyente, que la gran dimensión final de Ras-WT no depende de su tamaño inicial, sino del gen transferido. **N de las muestras:** En la figura 24A corresponde al promedio de todos los corazones, en la 24B sólo aquellos corazones muy grandes. Se analizan corazones de todos los grupos. Sham: 4, AoB: 2, RasVal12: 3, DN-Ras: 1, RasWT: 6

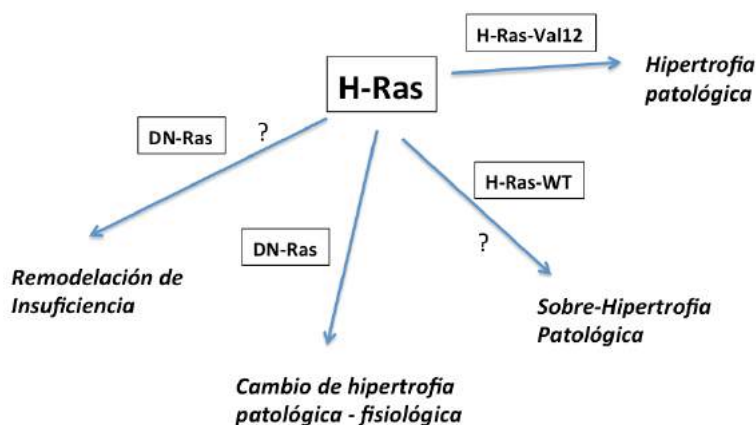
La figura 24 muestra que el tamaño final de los corazones no depende de su dimensión inicial. Sólo dos grupos tienen mayor crecimiento si al inicio se utilizaron corazones grandes: el control positivo (bandoe aórtico y sin virus), que aumenta aproximadamente de 2.8 a 3.1 y el grupo de bandoe más Ras-Val12, que aumenta de 3.1 a 3.5 en la proporción LVW/BW, pero estas dimensiones son bastante menores de la proporción de 4 LVW/BW de los corazones con Ras WT. Dicho de otro modo: el valor final depende de su condición experimental y no de su dimensión inicial. Esta observación nos permite mantener la principal conclusión de la tesis en cuanto a Ras-WT: éste causa un tipo de sobre-hipertrofia cardiaca. De cualquier modo, es necesario repetir el experimento cuidando que el valor basal sea similar al de los otros grupos..



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La presente tesis, junto con su artículo base (Ramos-Kuri 2015), añaden una pequeña pieza al rompecabezas de las vías de señales de la célula cardiaca. Las vías de señalización son sumamente complejas; desde su descubrimiento a muchas proteínas de la vía se les llamó oncogenes, por lo que muchos supusieron que serían la piedra de toque para resolver –de modo más o menos sencillo– el cáncer, aunque los ensayos posteriores demostraron que el problema es mucho más complejo de lo que parecía.

El presente trabajo aporta nuevos elementos para comprender la función del gen H-Ras en cardiomiocito, célula donde permanecen aún muchas interrogantes. Nuestros ensayos son importantes pues muestran su función *in vivo*, y de manera particular sugieren que a nivel cardiaco, Ras puede ser el punto de inflexión entre la hipertrofia fisiológica y la patológica (Fig. 25): La activación de Ras con su mutante activa, nos lleva a una hipertrofia de tipo patológico, su inhibición por H-RasN17, produce una hipertrofia más bien fisiológica, mientras la sobre-expresión de Ras-WT lleva, aparentemente, a una sobre-hipertrofia, fenómeno que aún falta por terminar de demostrar y caracterizar.

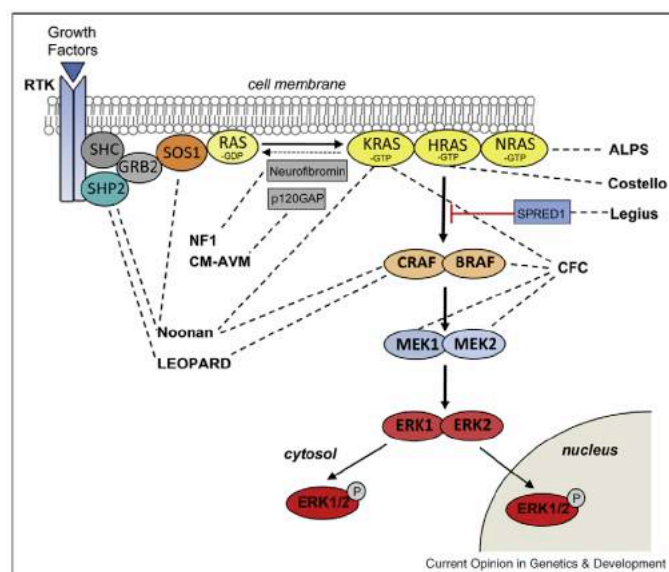


**Fig. 25. Papel central de Ras en la remodelación de hipertrofia cardiaca.** Esta gráfica resume las principales observaciones de la presente tesis. Los efectos de Ras sobre la modulación cardiaca son sorprendentes. Del cambio de hipertrofia patológica a fisiológica mostramos abundantes datos en el artículo base. De la hipertrofia patológica por Ras-Val12, hay abundantes datos en la literatura, corroborados en esta tesis. Dejamos con signo de interrogación dos efectos que apenas tenemos datos preliminares, pero que es importante continuar su investigación. Un efecto especialmente trascendente sería la remodelación de insuficiencia cardiaca.

En la presente discusión analizamos tres principales aspectos del trabajo: a) los efectos de H-Ras silvestre, sobre la hipertrofia cardiaca, que intenta ser un borrador previo a un posible artículo del tema. b) La posibilidad de que la DN-Ras pudiera mejorar la insuficiencia cardiaca, y c), queremos reflexionar en torno a las vías de señales y oncogenes, así como sus fenómenos paradójicos observados tan frecuentemente en los trabajos sobre oncogenes, y del que no estuvieron exentos nuestros ensayos.

Pero esta tesis presenta apenas una primera aproximación al problema. Se requiere definir con más precisión las características de los diversos tipos de hipertrofia y su relación con vías de señalización. Los estudios moleculares aplicados a la fisiopatología cardiaca, ayudarán a resolver algunas de estas dudas: ¿qué relación guardan la hipertrofia fisiológica anaerobia y la hipertrofia compensatoria?, ¿qué mecanismos moleculares están involucrados?, ¿qué genes, y qué vías son clave en cada tipo de respuesta?, ¿cómo se activa el paso de hipertrofia compensatoria a insuficiencia cardiaca?, ¿cómo se puede aprovechar todo este potencial de modulación celular a nivel terapéutico? Todas estas son dudas complejas que requerirán un gran esfuerzo a mediano y largo plazo para responderse.

Además, los resultados aquí presentados son importantes para comprender mejor la función de las vías de señales en las enfermedades causadas por la mutación de H-Ras o los genes de la vía clásica Ras, y que se resumen en la figura 26.



**Fig. 26. Principales síndromes relacionados con mutaciones a nivel de la vía de Señales Ras.**

**Abreviatura y breve descripción de los principales síndromes:**

**CFC:** síndrome Cardio-facio-cutáneo.

**Leopard:** Dismorfia facial y cardiopatía congénita:

**Noonan:** Lentiginosis múltiple (lunares), cardiopatía hipertrófica, estenosis valvular.

Muy frecuente (casi como Down 1:1000 a 1:2500)

**Costello:** muy parecido al síndrome de Noonan y al CFC. Miocardiopatía hipertrófica

### 1. La sobre-hipertrofia cardíaca por la variante silvestre de H-Ras

La H-Ras-WT transferida en ventrículos con sobrecarga ventricular, causó una gran hipertrofia, estadísticamente significativa. A pesar de que los resultados del trabajo de RasWT aún son preliminares, y que un dato sugiere mejoría funcional cardíaca por aumento de grosor ventricular (Figs. 19 y 20), los demás datos funcionales y moleculares sugieren una hipertrofia patológica. En cuanto a la sobre-hipertrofia por esta variante de Ras, aún se debe corroborar y caracterizar, para saber si pudiera representar un efecto benéfico a nivel fisiológico. Es importante también mencionar que como sugieren las figuras 23 y 24, la objeción de que los corazones utilizados inicialmente eran mayores, no parece ser la causa de la sobre-hipertrofia lo que nos permite utilizar los resultados de la Ras-WT para este primer análisis en la tesis, a reserva de corroborarlos posteriormente.

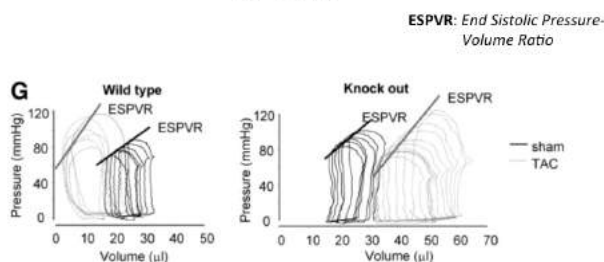
**La sobre-hipertrofia cardíaca causada por WT-Ras.** Desde los ensayos del artículo base de la tesis, observamos que las mutantes DN-Ras y RasVal12 producen cierta sobre-hipertrofia, aunque bastante menor que la causada por la Ras-WT y que no alcanzaron significancia estadística (Fig. 6, Ramos-Kuri 2015), por lo que no lo comentamos en aquél reporte. La WT-Ras, en cambio, causó una hipertrofia bastante mayor que el control positivo (AoB) o que las mutantes Ras (Fig. 18) con significancia estadística. Algunos autores refieren este tipo de sobre-hipertrofia, como hipertrofia inapropiada.

**Modificaciones fisiológicas de RasWT.** La función cardíaca de los corazones transferidos con la variante normal de Ras fue estudiada por medio de ecografía. Los resultados muestran un resultado ambivalente, aunque tiene características de hipertrofia patológica, en especial la disminución de fracción de eyección (Fig. 20) sugiriendo una hipertrofia similar a la producida por Ras-Val12, aunque ésta adelgaza las paredes ventriculares de manera significativa. Sin embargo, WT-Ras también mostró algunos datos a favor de mejoría funcional: en especial el mayor grosor de pared ventricular (Fig. 19).

Si consideramos como unidad la diferencial de tamaño entre corazones con operación ficticia (sham) con el grupo de sobrecarga ventricular, observamos que el grupo AoB-RasWT causa una sobre hipertrofia de proporción 3.5:1, lo que nos habla de una hipertrofia de grandes dimensiones, y con alta validez estadística (Fig. 18). Por otro lado, llama la atención de que a pesar de ser un corazón tan grande, sus dimensiones interiores sean equiparables a las de los otros grupos. Lo que también sugiere que aunque el corazón es muy grande, tiene excelente capacidad de contracción.

Aunque todo esto sugiere que Ras-WT causa un cambio sorprendente y muy interesante, de momento no podemos llegar a conclusiones claras, hasta no repetir el experimento y hacer la prueba de PV-Loop (Fig. 27). Todo esto nos anima a continuar con el trabajo.

#### Técnica de Presión/Volumen por cateterismo (PV-loop)



**Figura 27. Ejemplo de prueba de Presión volumen por cateterismo.** Se miden la presión y el volumen manejado por VI, registrados por medio de un catéter y bajo dos circunstancias: basal (sham) o al bloquear la aorta (TAC, Trans Aortic Constriction). Nótese en este ejemplo cómo es que el ratón con Knock-out de un gen, maneja un volumen mayor, más del doble, aunque una presión muy similar.

**Efectos de WT-Ras a nivel molecular.** La sobre-expresión de Ras es otro modo de producir su hiperfuncionalidad, el efecto básico de la mutante activa de Ras-Val12. La comparación de las modificaciones moleculares de Ras-WT con Ras-Val 12, corroboran esta observación (Tabla III); especialmente el incremento de expresión de los dos marcadores de hipertrofia patológica Beta-MHC y ANF (Fig. 5 Ramos Kuri 2015, y Fig. 22 de la tesis).

	A	B	C	D	E
	Hipertrofia fisiológica <i>Mc Mullen 2007</i>	AoB + DN-Ras <i>Ramos-K 2015</i>	Hipertrofia patológica <i>Mc Mullen 2007</i>	AoB + RasVal12 <i>Ramos-K 2015</i>	AoB + RasWT <i>Tesis actual</i>
* ANF	0	+	+++	+++	++++
* $\beta$ -MHC	0	0	+++	+++	+++
**SERCA2A	++	+	+	ND	ND

**Tabla III. Resumen de modificación molecular por las variantes de Ras.**<sup>9</sup> La comparación de nuestros resultados (B, D, E) contra los de McMullen y Jennings (2007) (A, C) muestran:

**a)** Gran similitud entre la DN-Ras y la hipertrofia fisiológica.

**b)** Ras-Val12 muestra marcadores moleculares similares a una hipertrofia patológica.

**c)** La variante silvestre de RasWT también causa, molecularmente, una hipertrofia de tipo patológica.

(\* Analizados por RT-PCR (Fig. 17) (\*\* Analizado por Western Blot (Fig. 22) ND: No realizado)

**Datos a favor de que la WT-Ras causa hipertrofia patológica.** Todos estos datos sugieren que la WT-Ras produce una hipertrofia patológica similar, aunque aún no podemos definir de modo conclusivo el tipo preciso de hipertrofia causada por la WT-Ras, su semejanza a Ras-Val12 sugiere que sí es patológica, aunque otros datos sugieren que podría tener algunos efectos benéficos, como es el fortalecimiento de la pared ventricular y el no incremento de volumen ventricular a pesar del gran tamaño del corazón. Aún requieren otros ensayos para publicarlo, por ejemplo: incrementar el número de animales del grupo de AoB + RasWT (actualmente son seis), realizar ensayos con corazones que sus dimensiones basales sean similares a los controles; y realizar la prueba fisiológica de medición de presión contra gasto intra-cardiaco (P-V Loop en inglés), realizar ensayos *in vitro*, así como otras pruebas moleculares para terminar de dilucidar el efecto de Ras-WT.

## 2. Posible efecto remodelador de la DN-Ras en insuficiencia cardiaca

**Expresión de SERCA2a inducida por DN-Ras.** Aunque el efecto de la DN-Ras sobre la hipertrofia, aquí discutimos el efecto sobre insuficiencia cardiaca. En especial el resultado aquí mostrado en cuanto la inducción de SERCA2a por la DN-Ras, fue el único dato extra e importante sobre la DN-Ras en la presente tesis (Fig. 17), no reportado en el artículo base.

A pesar de que no hicimos ensayos dirigidos a estudiar insuficiencia cardiaca, dos datos de nuestros ensayos sugieren que la modulación de Ras puede inhibirla. El Western Blot contra SERCA2a corrobora que mientras en hipertrofia no se incrementa su expresión, la DN-Ras sí lo logra (Fig. 17). Esta observación es importante pues sugiere que la DN-Ras, podría remodelar insuficiencia cardiaca, que sería mucho más importante que el cambio de hipertrofia patológica a fisiológica, y es otro importante trabajo pendiente de esta línea de investigación.

Como es bien sabido, SERCA2a no tiene un papel relevante en hipertrofia, como lo demuestra el artículo de MacMullen (Fig 1 de la tesis), pero está bien demostrado que SERCA2A es clave en insuficiencia cardiaca, donde su disminución es clave en la fisiopatología de la insuficiencia, mientras que al restituir su expresión en insuficiencia muestra un gran efecto benéfico (Hajjar 2000). El Doctor Roger Hajjar, jefe del Cardiovascular Research Center donde se realizó esta tesis, ha demostrado este beneficio al restituir su expresión en insuficiencia, en ensayos *in vitro*, *in vivo* y hasta ensayos de fase clínica III, con

terapia génica administrando SERCA2a como tratamiento de IC, ha dado resultados prometedores (ver la sección de avances en terapia génica de esta tesis).

También se sabe que ERK tiene función excesiva en insuficiencia cardiaca (Fig. 8 de la tesis, Haq 2001) nosotros en cambio, encontramos que la DN-Ras modula a ERK (Fig. 3, Ramos-Kuri 2015) otro dato que sugiere que la DN-Ras puede inhibir insuficiencia cardiaca.

En conclusión, dos datos sugieren que la DN-Ras inhibe insuficiencia: el Incremento de SERCA 2a y la Modulación negativa de ERK. Tanto JNK como P38 también están sobre-activados en insuficiencia cardiaca, aunque en nuestro trabajo no pudimos analizar estas dos vías, pendiente a realizar en ensayo posterior.

Como se mencionó previamente, la insuficiencia cardiaca es actualmente una de las principales causas de mortandad a nivel mundial, y el problema médico grave es la insuficiencia y no la hipertrofia. Estos años hemos estudiado la relación de Ras con hipertrofia porque se conocía bien el efecto pro o anti-hipertrófico por la activación-desactivación de Ras. Así pues, el ensayo de la figura 17 de esta tesis es importante porque sugiere que la DN-Ras puede ser útil también para insuficiencia cardiaca: otro trabajo pendiente de esta línea de investigación.

### 3. Ras y vías de señales: Observaciones paradójicas y contradictorias

**Dificultades experimentales para replicar fenómenos con oncogenes.** El trabajo con oncogenes es un trabajo muy complejo. Sobretudo porque estos genes presentan problemas experimentales como es la gran dificultad para replicar algunos de sus fenómenos, y la aparición de fenómenos de difícil interpretación, que a continuación analizamos.

Nos ha tocado observar fenómenos muy interesantes que aparecieron claramente en el transcurso de la experimentación pero que no se reprodujeron. Mencionamos dos ejemplos:

Uno de los primeros ensayos que hicimos con cardiocitos y la DN-Ras *in vitro*, mostró que estos cardiocitos latieron de manera sorprendentemente rápida, acompasada y generalizada, fenómeno que se observaba en todos los pocillos experimentales y que contrastaba claramente con los grupos control, donde latían como regularmente lo hacen: en pequeños grupos, independientes uno de otro, y lentamente.

Nunca logramos replicar ese latido con sólo la DN-Ras; pero sí algunos años después con una co-transfección; en un ensayo en que probamos la transferencia simultánea de dos oncogenes (teníamos la hipótesis de que la presencia de dos variantes de la misma vía podrían producir fenotipos más constantes), según presentamos en la tabla IV:

	WT-Raf	Active Raf
WT-Ras	+++	++
Ras-Val12	+	-
DN-Ras	+	

**Tabla IV.** Latido cardiaco bajo doble transferencia de genes. La transferencia de Ras-WT con Raf-WT mostró un latido sumamente rápido y sincrónico en toda la caja. Como explicamos en el texto, el ensayo no fue repetitivo

Como se observa en esta tabla, la conjunción de las variantes silvestres de Ras y Raf, también reprodujeron ese latido cardiaco intenso, claro, rítmico en todo el pozo, presente en todos las cajas transferidas y sólo donde se añadieron la dos variantes normales de Ras y Raf de manera simultánea,

mientras que los grupos controles y experimentales con otros genes, latían a ritmo normal (Tabla IV). Sin embargo el fenómeno tampoco se replicó.

No somos los únicos que hemos tenido este problema de falta de reproducibilidad de fenómenos interesantes con oncogenes. El Dr. Harold Varmus comentaba en una conferencia en el Hospital Mount Sinai, allá por el año 2009, que después de ver que las vías de señales estaban formadas por fosfatasas, probaron inhibidores de fosfatasas en pacientes con cáncer: con un primer paciente tuvieron un éxito sorprendente, revirtiendo un cáncer en estadio intermedio, pero no funcionó en ningún paciente subsecuente.

Aunque ese fenómeno de latido intenso con la DN-Ras nunca se repitió, después de *algunos años* de observación encontramos condiciones para producir un fenómeno similar pero, –más importante aún– reproducible: la mejoría del latido cardiaco al aplicar la DN-Ras en los cultivos de cardiocitos, de modo *sutil, pero claro y constante*, de donde nos basamos para hacer la figura 2A del artículo: La DN-Ras mantiene el latido por períodos prolongados de hasta por dos semanas. En ese ensayo se muestra que mientras la mutante activa detiene el latido al tercero o cuarto día de cultivo, la DN-Ras mejora el latido, la función del cardiocito y la formación de sarcómeros, comparado contra el control transferido con el Adeno- $\beta$ -gal y la mutante activa de Ras.

**Efectos contradictorios.** Otra dificultad experimental con estos oncogenes es la interpretación de algunos resultados, pues con cierta frecuencia producen fenómenos paradójicos, o poco explicables. Mencionamos algunos ejemplos que sucedieron durante este trabajo y que complicaron el estudio:

- La evasión de la inhibición de la DN-Ras por la fenilefrina. Nuestra primera reacción al observar que la DN-Ras bloqueaba la señal de AT-II pero no la de PE, era suponer que había errores de técnica. Hasta después de repetir el experimento varias veces y observar que efectivamente la señal de PE esquivaba al bloqueo de la DN-Ras, concluimos que estábamos ante un fenómeno muy interesante.
- Otro fenómeno difícil de explicar fue en el WB, donde la DN-Ras bajo ciertas circunstancias incrementa la señal de ERK, sobretodo los primeros días de la transferencia de genes in vitro. Después se estabiliza y la reduce, que es lo que publicamos.

Ejemplos de otros efectos paradójicos, reportado por otros autores:

- Cuando se comenzó a estudiar la vía Ras en cardiocitos, se descubrió que una DN-Raf no podía bloquear el efecto de Src525 una mutante activa de Src. Con esto se concluyó –erróneamente– que en cardiocito, Ras no activaría a la vía Raf-ERK sino que actuaría sólo a través de la vía Rac o Cdc42, y activando finalmente a las vías JNK y p38 (Force 1999). A favor de esta teoría también se encontró que la mutante activa de ERK no produce hipertrofia cardiaca. De hecho así se muestra en una figura de la época, y de nuestro grupo de trabajo en el Mount Sinai (entonces en Boston) (Fig. 28).
- También sería contradictorio el resultado entre el trabajo de Haq y el de Bueno donde muestran que en pacientes con hipertrofia patológica, la vía ERK no está sobre-activada, mientras que los ratones transgénicos ERK presentaron hipertrofia importante (Bueno 2002).

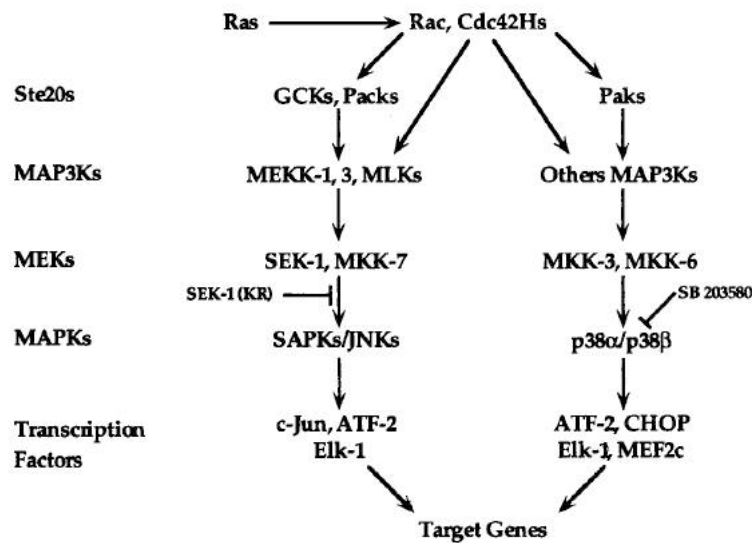


Figura 28. Modelo de la cascada de MAP cinasas presentada en el trabajo de Force (1999). Sobre vías de señales en HC, donde se observa cómo no se consideraba Raf dentro de la vía de señales en cardiocito. La figura está escaneada directamente del artículo original.

**Explicación de algunos fenómenos paradójicos.** La primera observación en torno a estas paradojas, es que son frecuentes en las vías de señales. Pero a veces sí tienen explicación, por ejemplo: Teresa Ramírez reportó que ratones transgénicos RasVal12 no activan ERK en corazón. En nuestro trabajo reportamos lo contrario: RasVal12 sí activa a ERK. Hasta ahí el fenómeno paradójico.

¿Cómo explicar este resultado contradictorio?: durante los primeros días de cultivo in vitro, Ras-Val12 activa a ERK (Fig. 2, Ramos-Kuri 2015), pero cuando los cardiocitos dejan de latir, Ras-Val 12 ya casi no activa a ERK –fenómeno que no reportamos–. Es probable que Ramírez haya analizado las células en un momento, en que ERK ya no es activado por RasVal12, que es justo lo que observamos cuando RasVal12 detiene la contracción de cardiocitos.

En otras ocasiones, estos fenómenos aparentemente contradictorios no son tales, sino que es por falsa apreciación de los investigadores. Frecuentemente cuando comparábamos la función de la dominante negativa al lado de la mutante con ganancia de función de Ras, queríamos siempre observar resultados antagónicos, fenómeno que muchas veces no sucedía, en parte porque la DN-Ras no tiene un efecto de pérdida de función tan potente.

Detrás de estos fenómenos, también podrían haber mecanismos de compensación intracelulares, que al bloquear la señal con la DN-Ras tienden a incrementar su señal, ¿sobreproducción de H K y N Ras al bloquearlo con la DN-Ras? ¿Aumento de señal por la propia variante dominante poco negativa pero en gran cantidad? Estas son sólo hipótesis, pues no tenemos datos experimentales para afirmar esto.

**Conclusión en cuanto a la dificultad para replicar ensayos y los resultados esporádicamente sorprendentes.** Los ejemplos anteriores muestran que los mecanismos de regulación de vías de señales son sumamente complejos, pero que finalmente son los que regulan a la célula. Por esto mismo tienen un gran potencial de aplicación clínica y terapéutica.

Como se muestra la figura 3, Ras tiene múltiples interacciones con muchas vías de señales, por lo que variaciones mínimas en las condiciones del modelo, producen estos efectos diferentes y aún contradictorios.

Entonces, la pregunta central es: ¿Cuáles son las condiciones, o factores decisivos para producir estos fenómenos sorprendentes? ¿Cuáles son los mecanismos de esta regulación? Estamos aún lejos de

*comprender* el fenómeno completo y las condiciones para modular estos fenómenos. Conocer a fondo todo los mecanismos de funcionamiento y regulación de estas vías de señales serían toda otra línea de investigación.

#### 4. Vía alterna de fenilefrina

**Modulación de la respuesta patológica a fisiológica.** La primera conclusión de nuestro trabajo publicado fue que la señal que viaja vía ERK es más fisiológica que la vía NFAT (Ramos-Kuri 2015, Fig. 8). Esta vía de Calcineurina-NFAT la analizamos por medio de ensayos con el promotor NFAT-luciferasa (figura 1D del artículo). Es bien conocido que la vía de calcineurina-NFAT causa hipertrofia patológica, encontrando que Ras-Val12 estimula esta vía,

La DN-Ras, por el contrario, no activa la vía de calcineurina y modula la vía ERK, propiciando una respuesta fisiológica (Fig. 29). Esta observación es importante, pues muestra las bondades de la modulación por la DN-Ras, más aún si se compara con otros agentes antihipertrofiantes como la ciclosporina, la cual inhibe hipertrofia por inhibición de Calcineurina, pero entonces causa insuficiencia cardíaca.

**Activación diferencial del cardiocito.** Pero la principal observación de nuestro trabajo, en cuanto a las vías de señalización, fue la activación diferencial de la vía clásica de Ras cuando es estimulada por PE o por AT-II, según se observó que la DN-Ras inhibe ERK cuando se activa por AT-II, pero no por PE (Fig. 3, Ramos-Kuri 2015). Esta respuesta diferencial muestra, en primer lugar, la complejidad de las vías activadas por estas hormonas, pero también manifiesta sus mecanismos subyacentes.

Tanto en el trabajo de Duquesnes como en el nuestro, se observó que el bloqueo de la DN-Ras (utilizando la misma DN-RasN17) puede ser evadido. Duquesnes encontró que la DN-Ras no bloquea la estimulación de ERK por estiramiento, pero sí lo bloquea bajo el estímulo de EGF (Factor de Crecimiento Epidermoide) mientras que en nuestro caso, sí bloquea al activarse por AT-II, pero no bloquea el estímulo por PE.

Pero también es importante aclarar que en nuestros ensayos, en cambio, Raf sí se bloquea por la DN-Ras bajo los dos estímulos (PE y AT-II).

Todas estas observaciones apoyan la principal conclusión de la presente tesis: la moderación parcial de la vía Raf-ERK (que inhibe el estímulo de AT-II, pero no inhibe el estímulo de PE, que inhibe Raf bajo los dos estímulos), modera la hipertrofia cambiándola de patológica a fisiológica, mientras que (como se observa en el trabajo de Haq), para activar la insuficiencia se requiere una alta activación de todas las vías de señalización: SAPK, ERK y p38 (Haq 2004; Fig 8 de la tesis).

#### **Tres posibles hipótesis sobre la vía alterna de señales para PE**

**a) Hipótesis nuestra.** Aunque no pudimos analizar a fondo las vías de señales (pues nuestro trabajo se centró en demostrar la modulación de respuesta patológica a fisiológica), hicimos un primer análisis de dos vías de hipertrofia: la vía clásica Ras y la vía Calcineurina/NFAT, bajo dos estímulos diferentes: AT-II y PE (figura 3 y 8 del artículo, Ramos-Kuri 2015).

En cuanto a la intensidad del bloqueo de la vía, corroboramos que la DN-Ras inhibe parcialmente a ERK cuando se estimula por Angiotensina, pero no bloquea el estímulo proveniente de PE. En cuanto a la capacidad de la DN-Ras de producir sólo un bloqueo parcial y no total de ERK, coincide con lo reportado: la DNRas-N17 no es una dominante del tipo “null-type” (un tipo de dominante negativa, que bloquea completamente la función del gen) (Fey 1988). Pero el mecanismo de evasión del bloqueo



cuando es activada por PE si es una observación original de la tesis, también reportado por Duquesnes aunque en otra situación.

**a) Hipótesis de Duquesnes.** Como mencionamos previamente Duquesnes también encontró que la DN-Ras N17 bloquea los estímulos provenientes por EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidermoide), pero no el estímulo por estiramiento de la fibra cardiaca. El mecanismo que propone es por la existencia de una vía independiente que Duquesnes sugiere que sea la vía Akt, aunque no aportó mayores pruebas de ello. También propuso que la vía alterna puede ser la vía de SPK, que sería activada por el receptor de estiramiento (de manera independiente al EGFR), a través de una tirosín cinasa que tampoco identifican sino sólo la nombran como tirosín cinasa “de membrana o citosólica” (Duquesnes 2009).

**c) Hipótesis de Major.** Major (2015) analizó las vías activadas por beta adrenérgicos en cardiocitos (PE es un beta adrenérgico), como el artículo apareció apenas un mes antes del nuestro no pudimos discutir en nuestra publicación.

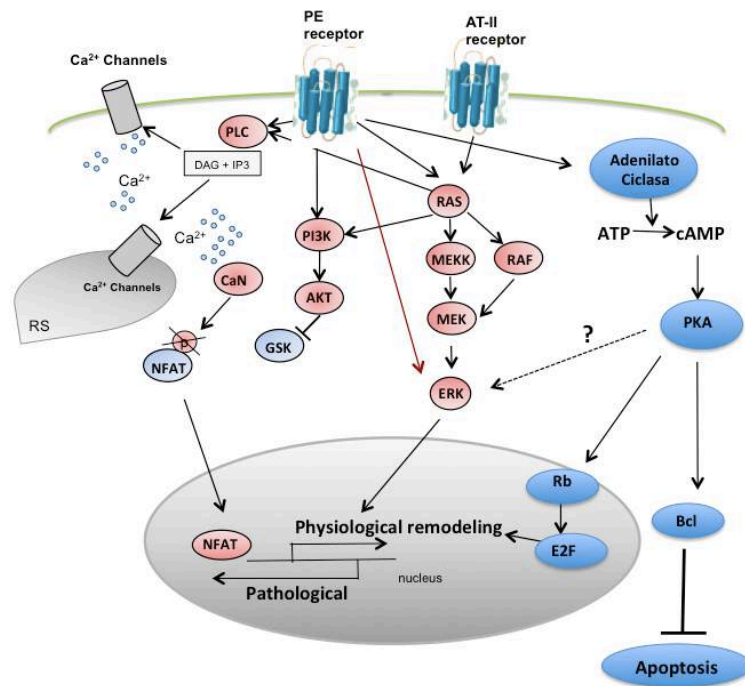
Ratones transgénicos con el gen E2F6, el cual inhibe a la vía E2F–Rb, desarrollan cardiomiopatía dilatada a la segunda semana de vida, sin hipertrofia previa (Major 2015). Interesantemente, la administración de isoproterenol (agonista de la vía adrenérgica) en ese modelo evita la cardiomiopatía.

El isoproterenol activa las siguientes señales: a) receptores beta adrenérgicos, b) receptores G triméricos, y c) la señal viaja a través de la vía beta2-adrenérgica, que activa primero a la PKA-C (subunidad C de la Protein Kinasa A), induciendo finalmente la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 y activa a E2F3, el cual activa el paso de la célula a la fase S del ciclo.

La vía alterna que observamos en nuestro ensayo, podría ser ésta de proteínas G triméricas que, como mencionamos en el párrafo anterior, inhibe apoptosis a través Bcl-2 (Fig. 29). Cabe mencionar que un mecanismo clave en la activación de insuficiencia cardiaca, es la apoptosis (Kang 2,000). En nuestro ensayo no medimos apoptosis, pero si la DN-Ras inhibe apoptosis a través de estas proteínas G-triméricas, ésta podría ser el mecanismo utilizado por la DN-Ras para mantener lo cardiocitos *in vitro* por periodos prolongados, como demostramos en nuestro trabajo base de la tesis (Ramos-Kuri 2015, Fig. 2A), y que aquí actualizamos en la figura 28, en la vía color azul.

**Conclusiones con respecto a las vías de señalización involucradas con Ras.** *“La complejidad de la red de traducción de señales es abrumadora, por el gran número de constituyentes que interactúan, por la complejidad del circuito, porque involucra redes y mecanismos de pro y retro- alimentación, así como de intercomunicación (cross talk) y por el hecho de que la cinética de la interacción es muy compleja”* (Hornberg 2005).

Nuestro trabajo corrobora esta complejidad de las vías, y ofrece además algunas pistas sobre sus mecanismos subyacentes. La figura 28 de la tesis (basada en la figura 8 de nuestro artículo), resume las posibilidades arriba mencionadas: principalmente incorpora las observaciones de Major, que corresponde a la vía beta adrenérgica activada por isoproterenol (también activada por PE), activando una hipertrofia fisiológica a través de E2F y Bcl2. Es probable que la activación de ERK por PE que observamos en nuestro trabajo, sea por esta vía. También es probable que el efecto benéfico que observamos por la DN-Ras sea por la estimulación de estos fenómenos: anti apoptosis e hipertrofia activados por E2F.



**Figura 29. Vías de señales activadas en hipertrofia cardíaca patológica y fisiológica.** En este esquema ampliamos lo reportado en la figura 8 del artículo. Añadimos la vía de adenilato ciclasa activada por el receptor de PE, que tiene un claro efecto benéfico, al inhibir apoptosis, por activación de Bcl, y un efecto pro-hipertrofia fisiológica al activar Rb y E2F (Major 2015). Dejamos en signo de interrogación la activación de ERK por esta vía, pues aunque está descrita esta activación, no lo estudiamos en nuestro artículo.

El estudio experimental de las vías alternas utilizadas para esquivar la inhibición de la DN-Ras, que observamos en nuestro trabajo, es algo pendiente de realizar. Pero será especialmente interesante investigar el papel de esta vía Rb-E2F en cardiocito, que en otros tipos celulares activa mitosis, tratando de responder la pregunta de si la activación de E2F por isoproterenol observada por Major, que se debe en primer lugar a su efecto antiapoptótico, pero, ¿hay quizá un efecto proliferativo que ayude a la mejoría fisiológica de los corazones de ratón transgénico E2F6 cuando recibieron isoproterenol? Estas es otra razón importante que justifica la continuidad del estudio de Ras a nivel cardíaco, a fin de comprender y aprovechar mejor estas vías de señales.

## 6. Sobre el nombre oncogén

No quisiera terminar la presente tesis, sin comentar lo equívoco del nombre de estos genes. La nominación que damos a un ente, es trascendental en su uso y comprensión. A pesar de su gran aceptación entre investigadores y profesionistas de ciencias médicas, el nombre es muy equívoco, pues sugiere que su función es causar cáncer... De hecho hasta a la variante normal del gen se le llama proto-oncogén... Este segundo nombre termina por completar el equívoco. Por ejemplo, una proto-enzima es la molécula precursora de la enzima, su existencia se debe como precursora de una enzima y así evitar daño en su transporte celular. Así parecería que el proto-oncogén *debe* transformarse en oncogén...

Más que oncogenes, son genes de regulación celular, por lo que un nombre más preciso sería homeo-genes, haciendo referencia a que regulan la homeostasis celular y que, como una de sus características cuando mutan o se altera su expresión, pueden causar cáncer, que entonces sería correcto llamarle oncogén, pero sólo se le debe llamar así al gen ya mutado y causante de cáncer. Sin

embargo el nombre de homeo-gen podría confundirse con el de los homeo-boxes, por lo que quizá sería mejor nombrarlos genes de homeostasis celular.

## 5. Ruta de trabajo para continuar la investigación de H-Ras en corazón

- A. Terminar ensayos con la WT-Ras, los resultados son interesantes, en especial los datos que sugieren que se trata de una sobre-hipertrofia.
- B. Análisis detallado del efecto de Ras a nivel de insuficiencia cardíaca. Entre otros aspectos debemos analizar las cuatro vías de señalización especialmente la p38 y SAPK. Quizá este trabajo sea más sencillo de lograr que el descrito en A.
- C. Probar el efecto de la inhibición de Ras en modelos de hipertrofia a largo plazo e insuficiencia. Para lo cual se requiere sobretodo un vector viral que mantenga la expresión del gen transferido por períodos más prolongados, como los virus Adeno-asociados.
- D. Se podrían estudiar las vías de señalización comparando la función de Ras y vías de señalización en tres tipos celulares modificados por Ras. RasVal12 puede llevar a tres fenómenos distintos dependiendo de la célula en que se pruebe:
  - En células cardíacas produce hipertrofia celular, sin replicación de ADN ni mitosis;
  - En células Hela lleva a replicación de ADN y núcleo, pero sin mitosis,
  - En la mayoría de tejidos llevará a transformación celular y formación de neoplasias.
  - En cardiomiocito lleva a hipertrofia.

Estos tres modelos de función de Ras pueden ayudar a estudiar el dato mencionado por Frame y Balme (2000) de que Ras estimula respuestas diversas y hasta antagónicas, *dependiendo del tipo celular y el contexto biológico* en el que funciona.

Sería muy interesante analizar por fosfo-WB las vías activadas por Ras para producir estos tres diferentes fenotipos. Se pueden añadir diferentes estímulos, con las mutantes activa y negativa de Ras. Esto demostraría claramente los mecanismos finos de balance, regulación y cross-talk activadas por Ras.

**Posibilidades de terapia génica con la inhibición de H-Ras y vías de señalización** La remodelación de hipertrofia cardíaca de patológica a fisiológica por medio de la inhibición del gen H-Ras es el principal hallazgo de la presente tesis, que por un lado demuestra el papel central de Ras en la modulación de la respuesta patológica, y por otro ayuda a comprender mejor la fisiopatología de las vías de señales en cardiocito; tema que aún tiene mucho por investigar.

La ausencia del efecto anti-hipertrofiante in vivo por parte de la mutante DN-Ras no es de preocupar; por el contrario la modulación selectiva de vías de señales por la DN-Ras es muy interesante, pues el solo efecto anti-hipertrofico no es suficiente para inhibir la patología, como en el caso de la ciclosporina que disminuye hipertrofia, inhibiendo NFAT, pero que termina en insuficiencia (Chouckron 1999, Perandurai 2011). Por el contrario, la DN-Ras modula hipertrofia y a la vez mejora función cardíaca.

Dos datos experimentales adicionales sugieren que la DN-Ras tiene potencial de modular no sólo hipertrofia sino también insuficiencia cardíaca: la expresión de SERCA2a (Fig. 17 de la tesis) y de Beta-MHC (Fig. 5 de Ramos-Kuri 2015) por la DN-Ras.

En cuanto a la sobre-hipertrofia producida por la variante silvestre de Ras, confirma el papel central de éste en la respuesta hipertrofica cardíaca, y sugiere otra posible aplicación en clínica de la modulación de Ras.

Todos estos resultados muestran que la modulación de Ras tiene buenas posibilidades de aplicarse en clínica principalmente en hipertrofia e incluso insuficiencia cardiaca, mostrando la importancia de continuar el estudio del papel y mecanismos de acción de Ras, a fin de corroborar los presentes resultados y confirmar su posible papel benéfico en insuficiencia cardiaca.

En la presente tesis hemos querido mostrar todo el potencial terapéutico de Ras, y mostrar la importancia de continuar nuestro estudio, y aunque su posible aplicación clínica no será inmediata, en el camino se van descubriendo sus complejos mecanismos de acción y regulación y aparecen moléculas relacionadas con los oncogenes que tienen posibilidades de aplicación.

**Vías de señales y terapia génica.** El uso clínico de la modulación de hipertrofia cardiaca por la DN-Ras es aún lejano, pero prometedor. Actualmente no existen inhibidores químicos de Ras, pero se están diseñando algunos inhibidores basados en la estructura de sitios activos de Ras: (*structure-based drug design*, SBDD) (Shima 2015) que serían más sencillos de utilizar en clínica que la transferencia del gen. También podría probarse el RNA inhibidor, siRNA, que utilizamos en algunos de nuestros ensayos *in vitro* (Fig. 4, Ramos-Kuri 2015), que tendría menos efectos secundarios potenciales que la transferencia del gen DN-RasN17.

En algunos casos, la modulación de vías de señales puede aplicarse a través de moléculas sencillas. Recientemente se demostró el efecto remodelador benéfico del retinol a nivel cardiaco: Pacientes con infarto al miocardio activan el receptor a ácido retinoico, y pacientes sanos cardiológicamente a los que se les administró ácido 13-cis retinoico, produce una hipertrofia cardiaca concéntrica (Bilbija 2012). Dado que es una molécula de origen natural, podría probarse para insuficiencia cardiaca o algunos tipos de hipertrofia.

Mencionamos un último ejemplo de terapia génica en enfermedades degenerativas: a partir del conocimiento del síndrome de Down (SD) se han descubierto detalles a nivel de vías de señales, que potencialmente podrán modular enfermedades como Alzheimer o el crecimiento de tumores sólidos desde las vías de señales. La sobre-expresión de los genes presentes en el cromosoma 21, han dado luces importantes sobre estas dos enfermedades.

La existencia de tres copias del cromosoma 21 hace que los genes de este cromosoma estén sobre expresados. Por otro lado es bien sabido que hasta el 80% de pacientes con SD desarrollan enfermedad de Alzheimer. Se ha encontrado que el gen DYRK1A, presente en el cromosoma 21 está relacionado con la génesis del Alzheimer; el mecanismo es que DYRK1A fosforila a la proteína beta amiloide y a TAU. El exceso de esta enzima causa híper fosforilación y precipitación de ambas proteínas, llevando a Alzheimer. La modulación de DYRK1A podrá dar tratamiento para el Alzheimer, tanto en población general como en pacientes con SD (Ramos-Kuri y Salgado-Sánchez 2015).

También se sabe que los pacientes con SD tienen un bajo índice de tumores sólidos. En este caso el mecanismo es por inhibición del factor VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) por parte del gen sobre-expresado de DSCR-1, presente en cromosoma 21, el cual activa a calcineurina1, y éste finalmente inhibe a VEGF, bloqueando así la vascularización tumoral y finalmente el crecimiento de tumores sólidos. La regulación a través de DSCR-1 tendría una amplia aplicación en terapia de tumores.

La posibilidad de modulación de hipertrofia cardiaca por el gen Ras puede ser mucho más sencilla que para cáncer. En éste último caso las múltiples mutaciones y alteraciones cromosomales, hacen casi imposible que la modificación de un solo gen logre revertir los intrincadísimos cambios morfológicos, genéticos y cromosómicos de la célula cancerosa. En cambio en un cardiomiocito con sólo algunas alteraciones a nivel de vías de señales sí creemos que podría lograrse, de modo relativamente sencillo, una modificación terapéutica.

Así, aunque la moderación de las vías de señales no son fáciles de lograr, sus posibilidades de aplicación terapéutica, especialmente en enfermedades degenerativas, tanto en el caso de Alzheimer, como en nuestro caso en hipertrofia e insuficiencia cardíaca, confirman la importancia de continuar con los estudio en mecanismos y posibles aplicaciones terapéuticas.

## REFERENCIAS

1. Adams JW. 1998. **Enhanced G $\alpha$ q signaling a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:10140-10145.
2. Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Dutly AE, et al. 2013. **EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation.** *Int. J. Med. Sci.* 10(3):320-30
3. Anversa P, Leri A, Kajstura J. 2006. **Cardiac regeneration.** *J Am Coll Cardiol.* 47(9):1769-76.
4. Bilbija D, Haugen F, Sagave J, Baysa A, Bastani N, Levy FO, Sirsjö A, Blomhoff R, Valen G. 2012. **Retinoic acid signalling is activated in the post-ischemic heart and may influence remodelling.** *PLoS One.* 7(9):e44740.
5. Bishop MJ. 1989. **Retroviruses and Oncogenes II.** Les Prix Nobel 1989. *The Nobel Foundation* 1990.
6. Blair JE, Huffman M, Shah SJ. 2013. **Heart failure in North America.** *Curr Cardiol Rev.* 9(2):128-46.
7. Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. 1997. **Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates.** *J. Clin. Invest.* 100:2189-2195.
8. Bueno OF, and Molketin JD. 2002. **Involvement of Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in Cardiac Hypertrophy and Cell Death.** *Circ Res.* 91:776-781.
9. Buleje SJ, Yábar BA, Guevara-Fujita M, Fujita R. 2012. **Características genético-moleculares de los tumores estromales gastrointestinales (GIST).** *Rev. Gastroenterol. Perú* 32 (4)
10. Chen XH, Minatoguchi S, Kosai K, Yuge K, Takahashi T, Arai M, Wang N, Misao , Lu C, Onogi , Kobayashi, Yasuda S, Ezaki M, Ushikoshi , Takemura G, Fujiwara T. 2007. **In vivo hepatocyte growth factor gene transfer reduces myocardial ischemia-reperfusion injury through its multiple actions.** *J Card Fail.* 13(10):874-83.
11. Choukron G, Hajjar RJ, Fry S, del Monte F, Haq S, Guerrero JL, Picard M, Rosenzweig A, and Force T. 1999. **Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein-kinases/c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases.** *J. Clin. Invest.* 104(4):391-398.
12. Chien KR, Hoshijima M. 2004. **Unravelling Ras signals in cardiovascular disease.** *Nat. Cell Biol.* 6(9):207-208
13. Clerk A, Sugden PH. 2000. **Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy,** *Circ. Res.* 86:1019–1023.
14. D'Angelo DD1, Sakata Y, Lorenz JN, Boivin GP, Walsh RA, Liggett SB, Dorn GW 2nd. 1997. **Transgenic Galphaq overexpression induced cardiac contractile failure in mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:8121-8126.
15. Duquesnes, N, F Vincent, E Morel, F Lezoualc'h, B Crozatier. 2009. **The EGF receptor activates ERK but not JNK Ras-dependently in basal conditions but ERK and JNK activation pathways are predominantly Ras-independent during cardiomyocyte stretch.** *Intern J. Bioch & Cell Biol.* 41: 1173-1181.
16. Esteban LM, Vicario-Abejón C, Fernández-Salguero P, Fernández-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Malumbres M, McKay R, Ward JM, Pellicer A, Santos. 2001. **Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development.** *E. Mol Cell Biol.* 21(5):1444-52.
17. Feig, LA, and Cooper GM. 1988. **Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP.** *Mol. Cell. Biol.* 8: 3235–3243.
18. Field LJ.1988. **Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice.** *Science.* 239(4843):1029-33.
19. Fernandes T, Soci UPR, Oliveira EM. 2011. **Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants.** *Brazil. J. Med. Biol. Res.* 44:838-847.
20. Force T, Hajjar RJ, del Monte F, Rosenzweig A and Choukroun G. 1999. **Signaling Pathways Mediating the Response to Hypertrophic Stress in the Heart.** *Gene Express.* 7:337-348.
21. Fuller SJ, Gillespie-Brown J and Sugden P. 1998. **Oncogenic src, raf, and ras Stimulate a Hypertrophic Pattern of Gene Expression and Increase Cell Size in Neonatal Rat Ventricular Myocytes.** *J. Biol. Chem.* 273 (29):18146-18152.

22. Gottshall KR, Hunter JJ, Tanaka N, Ross JJ and Chien KR. 1997. **Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4710-4715.
23. Hajjar RJ, del Monte F, Matsui T, Rosenzweig A. 2000. **Prospects for Gene Therapy for Heart Failure.** *Circ. Res.* 86:616-621
24. Haq S, Choukroun G, Lim H, Tymitz KM, del Monte F, Gwathmey J, Grazette L, Michael A, Hajjar RJ, Force T, Molkentin JD. 2001. **Differential activation of signal transduction pathways in human hearts with hypertrophy versus advanced heart failure.** *Circ.* 103:670-677.
25. Hernández-Gutiérrez S, García Peláez I, Zentella A, Ramos Kuri M, Hernández-Franco P, Hernández Sánchez F y Rojas E. **NF- $\kappa$ B signaling blockade by Bay 11-7085 during early cardiac morphogenesis induces alterations of the outflow tract in chicken heart.** *Apoptosis.* 2006. 11(7):1101-9.
26. Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ. 2004. **Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload,** *Circulation.* 110:718–723.
27. Hernández-Gutiérrez S, Ramos Kuri M y Rojas del Castillo E. 2008. **Cardiac Role of the transcription Factor NF- $\kappa$ B.** *Cardiovascular and Haematological Disorders-Drug Targets.*
28. Ho PD, Zechner DK, Dillmann WH, Glembotski CC, McDonough PM. 1998. **The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes.** *J Biol Chem.* 273(34):21730-5.
29. Hornberg H, Binder B, Bruggeman FJ, Schoeberl B, Hinrich R and Westerhoff HV. 2005. **Control of MAPK signaling: from complexity to what really matters.** *Oncogene.* 24: 5533-5542.
30. Hunter JJ, Tanka N, Rockman HA, Ross JJ and Chien KR. 1995. **Ventricular expression of a MLC-2v-ras Fusion Gene Induces Cardiac Hypertrophy and Selective Diastolic Dysfunction in Transgenic Mice.** *J. Biol. Chem.* 270, (39); 23173-23178.
31. Ishikawa K, Fish K, Aguero J, Yaniz-Galende E, Jeong D, Kho C, Tilemann L, Fish L, Liang L, Eltoukhy A A, Anderson DG, Zsebo K, Costa KD, Hajjar RJ. 2015. **Stem cell factor gene transfer improves cardiac function after myocardial infarction in swine.** *Circ Heart Fail.* 8(1):167-74.
32. Jeyaraj SC, Unger NT, Chotani MA. 2011. **Rap1 GTPases: an emerging role in the cardiovascular.** *Life Sci.* 88 645–652.
33. Kai H, Muraishi A, Sugiu Y, Nishi H, Seki Y, Kuwahara F, Kimura A, Kato H, Imaizumi T. 1998. **Expression of proto-oncogenes and gene mutation of sarcomeric proteins in patients with hypertrophic cardiomyopathy.** *Circ Res.* 83(6):594-601.
34. Kang PM and Izumo S. 2000. **Apoptosis and heart failure. A critical review of the literature.** *Circ. Res.* 86:1107-1113.
35. Koera KKN, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A and Katsuki M. 1997. **K-Ras is essential for the development of the mouse embryo.** *Oncogene,* 15:1151-1159.
36. Labeche D, Kang ZB and Hajjar RJ. 2001. **Candesartan abrogates G protein-coupled receptors agonist-induced MAPK activation and cardiac myocyte hypertrophy.** *J Renin-Angiot-Aldosterone Syst.* 2 (suppl. 1):5154-5161.
37. Lakkis MM and Epstein JA. 1998. **Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial mesenchymal transformation in the developing heart.** *Devel.* 125, 4359-4367.
38. Lezoualc'h F, Metrich M, Hmitou I, Duquesnes N, Morel E. 2008. **Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy,** *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44:623–632.
39. Li TG, Kosai K, Yuge K, Nagano S, Esaki M, Goto K, Takahashi T, Hayakawa K, Koda M, Kawase , Maruyama R, Okada , Minatoguchi S, Mizuguchi , Fujiwara T, Fujiwara. 2003. **Post-infarction treatment with an adenoviral vector expressing hepatocyte growth factor relieves chronic left ventricular remodeling and dysfunction in mice.** *Circulation.* 107(19):2499-506.
40. Liao P, Georgakopoulos D, Kovacs A, Zheng M, Lerner D, Pu H, Saffitz J, Chien K, Xiao RP, Kass DA and Wang Y. 2001. **In vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy.** *PNAS.* 98 (21): 12283-12288.

41. Major JL, Salih M, Tuana Bs. 2015. **Interplay between the E2F pathway and  $\beta$ -adrenergic signaling in the pathological hypertrophic response of myocardium.** *J Mol Cell Cardiol.* 84:179-190.
42. McMullen JR and Jennings GL. 2007. **Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure.** *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 34:255-262.
43. Meguro T. 1999. **Cyclosporin attenuates pressure-overload hypertrophy in mice while enhancing susceptibility to decompensation and heart failure.** *Cir. Res.* 84: 735-740.
44. Mihailescu LS. 2005. **Propiedades fundamentales del miocardio.** Capítulo 5, en: *Fisiología Médica.* René Drucker Colín. Editorial Manual Moderno, México, 938 pp.
45. Miranda EI, Santana C, Rojas E, Hernández S, Ostrosky-Wegman P, García-Carrancá A. 1996. **Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c--ras.** *Mutation Res* 349, 173-182.
46. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A. 2003. **A matter of life and death: cardiac myocyte apoptosis and regeneration.** *J Clin Invest.* 111(10): 1457-9.
47. Nagalingam, RS, NR Sundaresa, MP Gupta, DL Geenen, RJ Solaro and M Gupta. 2013. **A cardiac-enriched microRNA, miR-378 blocks cardiac hypertrophy by targeting Ras signaling.** *J Biol Chem.* 288:11216,11232.
48. Nguyen R, Mir T, Kluwe L, Jett K, Kentsch M, Mueller G, Kehrer-Sawatzki , Friedman J, Mautner VF. 2012. **Cardiac characterization of 16 patients with large NF1 gene deletions.** *Clin Genet.* 2012 Dec 28. (Ahead of publication).
49. Petkova SB, Ashton A, Bouzahzah B, Huang H, Pestell RG, Tanowitz HB. 2000. **Cell Cycle Molecules and Diseases of the Cardiovascular System.** *Frontiers in Bioscience* 5:452-460.
50. Perundurai SD, Fabris F, Tonk R, Illaste A, Karakikes I, Sorourian M, Sheng J, Hajjar RJ, Tartaglia M, Sobie EA, Lebeche D, Gelb BD. 2011. **Cyclosporine attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by RAF1 mutants in Noonan and LEOPARD syndromes.** *J Mol Cell Cardiol.* 51(1):4-15.
51. Potenza N, Vecchione C, Notte A, De Rienzo A, Rosica A, Bauer L, Affuso A, De Felice M, Russo T, Poulet R, Cifelli G, De Vita G, Lembo G, Di Lauro R. 2005. **Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice.** 2005. *EMBO Rep.* 6(5):432-7.
52. Pracyk JB, Hegland DD, Tanaka K. 1997. **Effect of a dominant negative ras on myocardial hypertrophy by using adenoviral-mediated gene transfer.** *Surgery* 122:404–410 (discussion 410–411).
53. Pray L. 2008. **Gleevec: the Breakthrough in Cancer treatment.** *Nat Educ* 1(1):37
54. Ramírez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, and Brown JH. 1997. **The MEKK-JNK Pathway Is Stimulated by  $\alpha$ 1-Adrenergic Receptor and Ras Activation and Is Associated with *in Vitro* and *in Vivo* Cardiac Hypertrophy.** *J Biol Chem.* 272 (22); 14057-14061.
55. Ramos-Kuri, Manuel, Kleopatra Rapti, Hind Mehel, Shihong Zhang, Perundurai S. Dhandapany, Lifan Liang, Alejandro García-Carrancá, Regis Bobe, Rodolphe Fischmeister, Serge Adnot, Djamel Lebeche, Roger J. Hajjar, Larissa Lipskaia and Elie R. Chemaly. 2015. **Dominant negative Ras (DNras) attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy.** *BBA-Molecular Cell Research (Biochemica et Biophysica Acta).* Vol. 1853: 2870-2884.
56. Ramos-Kuri M y Salgado-Sánchez E. 2015. **Avances moleculares en el síndrome de Down y su posible aplicación en neurología.** *Arch Neurocién (Mex).* 20(1): 65-78.
57. Sakata Y, Hoit BD, Liggett SB, Walsh RA, Dorn GW 2nd. 1998. **Decompensation of pressure-overload hypertrophy in Gaq-overexpressing mice.** *Circulation.* 97: 1488-1495.
58. Santana C, Ortega E, García-Carrancá A. 2002. **Oncogenic -Ras, induces cyclin B1 expression in a p53 independent manner.** *Mutat Res.* 31;508(1-2):49-58.
59. Sheelagh F and Balmain A. 2000. **Integration of positive and negative growth signals during ras pathway activation in vivo.** *Curr. Opin. Gen. Develop.* 10:106-113.
60. Schoen FJ. 2002. **El Corazón.** En: Robbins. Patología Estructural y Funcional, Editado por: Ramzi S. Cotran, Vinay Kumar y Tucker Collins. Editorial McGraw-Hill-Interamericana. México, 6ª Edición. pp. 571-630.



61. Schulz AI, Albrecht B, Arici C, van der Burg I, Buske A, Gillessen-Kaesbach G, Heller R, Horn D, Hubner CA, Korenke GC, Konig, y Kress, G Kruger, P Meinecke, J Mucke, B Pecko, E Rossier, et al. 2008. **Mutation and Phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome.** *Clin. Genet.* 73:62-70.
  62. Sen A, Dunmon P, Henderson SA, Gerard RD, Chien KR. 1988. **Terminally differentiated neonatal rat myocardial cells proliferate and maintain specific differentiated functions following expression of SV40 large T antigen.** *J Biol Chem.* 15;263(35):19132-6.
  63. Shima F, Matsumoto S, Yoshikawa , Kawamura T, Isa M, Kataoka T. 2015. **Current status of the development of Ras inhibitors.** *J Biochem.* 158(2):91-9.
  64. Soriano EA, Azevedo PS, Miot HA, Minicucci MF, Pansani MC, Matsubara LS, Okoshi K, Zornoff LAM, Matsubara BB, Paiva SAR. **Cardiac remodeling induced by 13-cis retinoic acid treatment in acne patients.** *Int Jour Cardiol.* 163 (1): 68–71
  65. Takahashi K and Yamanaka. 2006. **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** *Cell.* 126(4):663-76.
  66. Thorburn A, Thorburn J, Chen SY, Powers S, Shubeita HE, Feramisco JR and Chien KR. 1993. **HRas-dependent Pathways Can Activate Morphological and Genetic Markers of Cardiac Muscle Cell Hypertrophy.** *J Biol Chem.* 268(3): 2244-2249.
  67. Thorburn A. 1994. **Ras activity is required for phenylephrine-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cardiac muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 205(2):1417-22.
  68. Vidal M, Warner S, Read R, and Cagan RL. 2007. **Differing Src Signaling Levels Have Distinct Outcomes in *Drosophila*.** *Cancer Res.* 67:10278-10285.
  69. Wei BR, Martin PL, Hoover SB, Spehalski E, Kumar M, Hoenerhoff MJ, Rozenberg J, Vinson C, Simpson RM. 2011. **Capacity for resolution of Ras-MAPK-initiated early pathogenic myocardial hypertrophy modeled in mice.** *Community Med.* 61:109-118.
  70. Weiner LM. 2015. **Cancer Immunology for the clinician.** *Clin Adv Hematol Oncol.* 13(5):299-306.
  71. Yaniz-Galende E, Chen J, Chemaly E, Liang L, Hulot JS, McCollum L, Arias T, Fuster V, Zsebo KM, Hajjar RJ. 2012. **Stem cell factor gene transfer promotes cardiac repair after myocardial infarction via in situ recruitment and expansion of c-kit<sup>+</sup> cells.** *Circ Res.* 111(11):1434-45.
  72. Zhang GX, Kimura S, Murao K, Yu X, Obata K, Matsuyoshi H, Takaki M. 2010. **Effects of angiotensin type I receptor blockade on the cardiac Raf/MEK/ERK cascade activated via adrenergic receptors.** *J. Pharmacol. Sci.* 113:224–233.
  73. Zheng M, Dilly K, Dos Santos Cruz J, Li M, Gu , Ursitti JA, Chen J, Ross J, Chien KR, Lederer JW, Wang . 2004. **Sarcoplasmic Reticulum Calcium Defect in Ras-induced Hypertrophic Cardiomyopathy heart.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286(1):H424-33.
-



## Dominant negative Ras attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy



Manuel Ramos-Kuri <sup>a,c,d,e,f,\*</sup>, Kleopatra Rapti <sup>a,1</sup>, Hind Mehel <sup>i,j,1</sup>, Shihong Zhang <sup>a</sup>, Perundurai S. Dhandapany <sup>b</sup>, Lifan Liang <sup>a,d,2</sup>, Alejandro García-Carrancá <sup>f</sup>, Regis Bobe <sup>h</sup>, Rodolphe Fischmeister <sup>ij</sup>, Serge Adnot <sup>g</sup>, Djamel Lebeche <sup>a,d,2</sup>, Roger J. Hajjar <sup>a,d,2</sup>, Larissa Lipskaia <sup>a,g,3</sup>, Elie R. Chemaly <sup>a,d,3</sup>

<sup>a</sup> Cardiovascular Research Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, NY, USA

<sup>c</sup> Centro de Investigación Social Avanzada, Querétaro, Mexico

<sup>d</sup> Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA, USA

<sup>e</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Panamericana, Mexico

<sup>f</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>g</sup> INSERM U955 and Département de Physiologie, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, 94010, Créteil, Université Paris-Est Créteil (UPEC), France

<sup>h</sup> INSERM U770, Université Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>i</sup> INSERM UMR-S 1180, LabEx LERMIT DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France

<sup>j</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2015

Received in revised form 6 August 2015

Accepted 6 August 2015

Available online 8 August 2015

#### Keywords:

Heart failure

Cardiac hypertrophy

Ras oncogene

Pathological hypertrophy

Physiological hypertrophy

Ras inhibition

### ABSTRACT

The importance of the oncogene Ras in cardiac hypertrophy is well appreciated. The hypertrophic effects of the constitutively active mutant Ras-Val12 are revealed by clinical syndromes due to the Ras mutations and experimental studies. We examined the possible anti-hypertrophic effect of Ras inhibition in vitro using rat neonatal cardiomyocytes (NRCM) and in vivo in the setting of pressure-overload left ventricular (LV) hypertrophy (POH) in rats. Ras functions were modulated via adenovirus directed gene transfer of active mutant Ras-Val12 or dominant negative mutant N17-DN-Ras (DN-Ras). Ras-Val12 expression in vitro activates NFAT resulting in pro-hypertrophic and cardio-toxic effects on NRCM beating and Z-line organization. In contrast, the DN-Ras was antihypertrophic on NRCM, inhibited NFAT and exerted cardio-protective effects attested by preserved NRCM beating and Z line structure. Additional experiments with silencing H-Ras gene strategy corroborated the antihypertrophic effects of siRNA-H-Ras on NRCM. In vivo, with the POH model, both Ras mutants were associated with similar hypertrophy two weeks after simultaneous induction of POH and Ras-mutant gene transfer. However, LV diameters were higher and LV fractional shortening lower in the Ras-Val12 group compared to control and DN-Ras. Moreover, DN-Ras reduced the cross-sectional area of cardiomyocytes in vivo, and decreased the expression of markers of pathologic cardiac hypertrophy. In isolated adult cardiomyocytes after 2 weeks of POH and Ras-mutant gene transfer, DN-Ras improved sarcomere shortening and calcium transients compared to Ras-Val12. Overall, DN-Ras promotes a more physiological form of hypertrophy, suggesting an interesting therapeutic target for pathological cardiac hypertrophy.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Small GTP binding-proteins are a superfamily of proteins acting as molecular switches between extracellular signals and molecular

*Abbreviations:* SR, sarcoplasmic reticulum; DAG, diacylglycerol; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; PLC, phospholipase C; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; AKT, protein kinase B; GSK, Glycogen synthase kinase-3beta; CaN, calcineurine, protein phosphatase 2B; NFAT, nuclear factor of activated T cells; MEKK, mitogen, activated protein kinase; ERK, extracellular signal-regulated kinase.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación Social Avanzada, Avenida Fray Luis de León No. 1000, CP 76190 Querétaro, Mexico.

E-mail address: [manuel.ramos@cisav.org](mailto:manuel.ramos@cisav.org) (M. Ramos-Kuri).

<sup>1</sup> HM and KR contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address for DL, LL and RJH.

<sup>3</sup> LL and ERC contributed equally to this work.

pathways [1,2]. The Ras subfamily is the most important of the GTPases and includes three main homologous variants: H-Ras, K-Ras and N-Ras. The 3 genes are expressed ubiquitously with some variation in patterns of expression and function in developing and adult tissues [3,4].

H-Ras hyperactivity in the cardiomyocyte is associated with hypertrophy [2,5]: *i*) In Costello's syndrome, patients with activating mutations of Ras develop hypertrophic cardiomyopathy with atrial tachycardia [6]. *ii*) Transgenic mice expressing the constitutively active mutant Ras-Val12 demonstrate ventricular hypertrophy similar to human hypertrophic cardiomyopathy [7]. *iii*) Mouse models of inducible cardiac overexpression of Ras-Val-12 have shown pathological features of cardiac hypertrophy [8]. Hypertrophy, deranged myofibril structure and impaired calcium transients are demonstrated in NRCM treated with Ras-Val-12 [9].

On the other hand, Ras deficiency or Ras dominant negative mutants are associated with cardiac hypotrophy or anti-hypertrophic effects: i) K-Ras knock-out mice embryos die by day 15.5 of development, with very thin walls of cardiac ventricles as the likely cause of embryonic death [3]. ii) Thorburn et al. [10] showed that Ras-Ala15 (a negative interferent mutant of Ras) inhibits NRCM hypertrophy activated by phenylephrine (PE). Fuller et al. showed that N17-DNRas (DN-Ras) inhibits the hypertrophic effect of the active mutant of Src-Phe527 [11]. iii) Pracyk et al. [12] demonstrated the anti-hypertrophic effect of the DN-Ras in neonatal cardiomyocytes at baseline, but not under stimulation by endothelin 1. iv) Recently, Nagalingam et al. [13] demonstrated the in vitro anti-hypertrophic effect of miR-378, a MicroRNA that negatively regulates Ras signaling in cardiac hypertrophy.

However, the study of the effects of Ras on cardiac hypertrophy is made difficult by the complex and poorly understood regulatory balance between proteins of the Ras superfamily; moreover, there are several examples of paradoxical responses to Ras-dependent stimuli, such as Ras and Rap1 divergent actions [1,14].

Ras mutants exert different actions at baseline or under ligand stimulation [12]. Duquesnes et al. [15] have shown that the ERK signaling pathway was down-regulated by DN-Ras in basal conditions but not under mechanical stimulation and Harris IS et al. [16] demonstrated apparently paradoxical actions of the Raf1-MAPkinase cascade. In mice expressing Ras-Val12 in the ventricles, the phenotype was variable and heterogeneous [5,7,17].

In this study, we hypothesized that the DN-Ras mutant N17 exerted an anti-hypertrophic effect in vivo, but we found a mixed agonist-antagonist action on the Ras pathway leading to cardiomyocyte hypertrophy or anti-hypertrophic effects, and the balance between the agonist and antagonist effects of DN-Ras was stimulus-dependent. Furthermore, and beyond the hypertrophic response, we investigated the impact of DN-Ras and active Ras-Val12 mutants on the pathologic character of cardiomyocyte hypertrophy. To that end, studies were conducted in vitro with and without pro-hypertrophic ligands, and in vivo in the setting of pressure-overload left ventricular (LV) hypertrophy (POH). To corroborate the results obtained by overexpressing dominant negative and active Ras mutants, a set of experiments was performed using siRNA-H-Ras on NRCM.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Recombinant adenovirus vectors

All recombinant adenoviruses were constructed using a cytomegalovirus (CMV) promoter. Cells were infected with adenovirus at 50 to 100 MOI (multiplicities of infection) per cell. We used recombinant adenoviral vectors encoding two variants of the H-Ras gene: the dominant negative mutant S17N (Ad-DNRas) and the oncogenic active mutant G12V (Ad-Val12). The DN-Ras mutant of Ras (substitution of asparagine for serine at the 17th amino-acid) is locked in its inactive form (Ras-GDP), due to a reduced affinity for GTP and preserved affinity for GDP [18]. The active mutant Ras Val12 (a substitution of glycine for valine, G12V, in the 12th amino-acid) was used as a positive control for DN-Ras [5]. Ad-βGal, encoding β-galactosidase under CMV promoter followed by target gene-IRES-reporter gene (a green fluorescent protein (GFP)) construct translated as two independent proteins [19] was used as an additional control; Ad.NFAT-Luc virus, carrying the luciferase reporter gene controlled by NFAT-responsive promoter [20] was used to measure NFAT activation. Ad-VIVIT, encoding NFAT competing peptide VIVIT and GFP under CMV promoter [21,22] was used as an additional control for NFAT-reporter experiments.

### 2.2. Isolation and culture of neonatal rat cardiomyocytes (NRCM)

Spontaneously beating NRCM were isolated from 1 to 2-day-old Sprague-Dawley rat pups using the Worthington Neonatal

Cardiomyocyte Isolation System (Worthington Biochemical Corp.) as previously described [23]. Cardiomyocytes were plated in 12-well plates for 36 h in serum-free medium then transduced with the recombinant adenoviruses (Ad-DNRas, Ad-Val12, or Ad-βGal) or no virus as control group.

For experiments using siRNA-H-Ras, NRCM were plated in 6-well plates in triplicates and transfected with 50 nM Hras-siRNA (Santa Cruz Biotechnology) with RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) for 24 h. Control cells were treated with only RNAiMAX Transfection Reagent for 24 h. Scramble siRNA had no effect on NRCM compared to control in observations published elsewhere [24] where scramble siRNA does not affect calcium transient and contractility in NRCM compared to control.

Cells were then serum starved for 30 h before they were stimulated with phenylephrine (PE) (1 μM) for an additional 24 h. Cells were then harvested and homogenized for RNA and proteins preparation.

### 2.3. Protein synthesis assay

Protein synthesis rate was measured using the [<sup>3</sup>H]-Leucine incorporation assay as previously described [23]. Briefly, NRCM were transduced with the relevant adenovirus for 48 h. Then, NRCM were stimulated for 7 h with PE (1 μM) or angiotensin-II (1 μM) in the presence of [<sup>3</sup>H]-Leucine. Protein synthesis was quantified by [<sup>3</sup>H]-Leucine incorporation measured by scintillation counting (MicroBeta Trilux, Perkin Elmer).

### 2.4. In vitro and in vivo cardiomyocyte size measurement

Cell surface areas were measured on micrographs using the ImageJ software (NIH). At least 50 individual cells were analyzed for each experimental condition. For in vivo experiments, the size of cardiomyocytes was evaluated on cross sections using Wheat germ agglutinin (WGA) Alexa Fluor® 488 conjugate (Invitrogen).

### 2.5. In vitro beating analysis

We designed a protocol to keep NRCM beating for prolonged periods of time, and analyzed the influence of experimental genes on beating. NRCM were maintained with 2% serum in the medium instead of serum-free (0.1% serum) medium. After 24 h with 2% serum, gene transfer was performed. Subsequent daily measurement of beating frequency was performed during 2 weeks. The beating frequency (beat/min) was counted in three different points of the well. The in vitro beating analysis was repeated three times, and with two wells per group each time.

### 2.6. Immunofluorescence

The sarcomeric structure of NRCM was analyzed by immunofluorescence with anti alpha-actinin (Sigma A2543), using standard protocol. Secondary antibody was a-rabbit IgG conjugated with Alexa 555 (Invitrogen). Slides were analyzed by confocal microscopy (Leica TCS-SP confocal microscopy).

### 2.7. Quantitative Real time PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen). Expression of H-Ras, beta-Myosin-heavy-Chain (β-MHC), atrial natriuretic factor (ANF) and B-type natriuretic peptide (BNP) mRNA in NRCM and LV tissue was quantified using real time RT-PCR (RT-PCR) analysis (7500 real-time PCR system, Applied Biosystems) performed according to standard procedures. Quantification of relative expression used the delta-delta-Ct approach. The following primers were used:

Rat-18S-F: 5'-GTTGGTTTTTCGGAAGTACTGAGGC-3'  
Rat-18S-R: 5'-GTCGGCATCGTTTATGGTGC-3'

Rat-H-Ras-F: 5'-AGAGTATAGTCCATGCCGGG-3'  
 Rat-H-Ras-R: 5'-CCGAGACTCAACAGTGGCA-3'  
 Rat ANF-F: 5'-ACC TGC TAG ACC ACC TGG AGG AG-3'  
 Rat ANF-R: 5'-CCT TGG CTG TTA TCT TCG GTA CCG-3'  
 Rat  $\beta$ -MHC-F: 5'-TTG GCA CGG ACT GCG TCA TC-3'  
 Rat  $\beta$ -MHC-R: 5'-GAG CCT CCA GAG TTT GCT GAA GGA-3'  
 Rat BNP-F: 5'-GCT GCT TTG GGC ACA AGA TAG-3'  
 Rat BNP-R: 5'-GGT CTT CCT ACA ACA ACT TCA-3'

## 2.8. Immunoblot analysis

Protein samples were prepared using a lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche), separated by SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes (Millipore). The membranes were blotted using standard protocol and revealed by chemiluminescence (Pierce). The following antibodies were used: p44/42 MAP kinase (Thr202/Tyr204) (Catalog No. 9101, Cell Signaling Technology); p44/42 MAP kinase (Catalog No. 9102, Cell Signaling Technology); Anti H-Ras proto-oncogene (Catalog No. SC-520 Santa Cruz Biotechnology), anti-pERK1/2, and anti-ERK1/2 (ref), Phospho-c-Raf (ser-259) (Catalog No. 9421 Cell Signaling Technology); Anti-Raf (Catalog No. 9422 Cell Signaling Technology) and anti-GAPDH: (Catalog No. 2118; Cell Signaling Technology). The densities of the immune-reactive bands were quantified using ImageJ software (NIH).

## 2.9. NFAT-promoter-Luciferase Reporter Assay

NRCM were infected with Ad.NFAT-LUC virus [20], 48 h after prior infection with Ras mutants and control adenoviruses. Ad-VIVIT and FCS (10%) were used as negative and positive controls, respectively, for NFAT-reporter experiments. Luciferase activity was measured using the Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity was normalized to total protein concentration for each sample as determined by Coomassie Protein Assay Reagent (Pierce), and results were expressed as relative luciferase units per microgram of protein (RLU/ $\mu$ g).

## 2.10. In vivo adenoviral gene transfer in a rat pressure overload LV hypertrophy (POH) model

Animal care and procedures were performed with the approval of institutional animal care committees in accordance with the National Institute of Health's guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Briefly, male rats (Sprague–Dawley, 250–300 g) were anesthetized with an intraperitoneal injection of a combination of Ketamine (50–100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). The animal was intubated and ventilated. Midline thoracotomy was performed and the heart exposed. Cardiac gene delivery was performed with adenoviral vectors as previously reported [25–27]. A 24-gauge Angiocath was advanced from the apex of the LV to the aortic root. The aorta and pulmonary arteries were cross-clamped simultaneously distal to the site of the catheter, injecting the solution of adenovirus or control (saline solution), containing approximately  $10^{10}$  plaque-forming units of the viruses, mixed with adenosine (50  $\mu$ l of a solution of adenosine 2 mg/ml). The cross-clamp was maintained for 30 s. The blanching of the heart during the cross clamping indicated effective intracoronary injection. After the adenovirus delivery, rats were subjected to ascending aortic banding with a 0.58 mm (internal diameter) tantalum clip as previously described [25,26]. A group of rats underwent a sham operation. The chest was vacuumed for removal of air and blood and closed in 3 layers. Four groups of animals were therefore studied a) Sham operated rats, b) POH with saline injection, c) POH with Ad.DN-Ras gene transfer, and d) POH with Ad.RasV12 gene transfer.

## 2.11. Echocardiography and morphometric analysis

In vivo LV size and function was assessed by echocardiography at baseline (before surgery) and two weeks after surgery (prior to animal sacrifice). Animals were sedated with an intra-peritoneal injection of ketamine (50 mg/kg). Transthoracic two-dimensional (2D) and M-mode echocardiography was performed with a General Electric Vivid 7 system (General Electric, New York, NY) using an i13L 14 MHz transducer. M-mode echocardiography was performed on a mid-papillary-level LV short axis view as previously described [28]. After terminal echocardiography, rats were sacrificed and their hearts harvested. LV and right ventricle were separated and weighed. A ring of tissue from the LV mid-cavity was embedded for histological analysis. The rest of the LV tissue was frozen for protein and RNA analysis. Selected hearts were used for cardiomyocyte isolation (see next paragraph).

## 2.12. Adult rat cardiomyocyte contractility and calcium transient assessment

Ventricular myocytes were isolated from rats two weeks after aortic constriction surgery and ras-mutant gene transfer via enzymatic dissociation, as previously described [29].

Cardiomyocytes were field-stimulated at a frequency of 1 Hz and were studied using the IonOptix system, as previously described [29]. Sarcomeric shortening and relaxation were assessed using a video-based edge detection system (IonOptix). Calcium transients were obtained by loading cells with 0.5  $\mu$ M fura2-AM (Invitrogen) and recording fluorescence measurements with a dual-excitation single-emission fluorescence photomultiplier system (IonOptix), as previously described [29].

## 2.13. Statistical analysis

Statistical analysis used Student's *T* test or corresponding non-parametric tests; statistical significance threshold was  $p < 0.05$ . All quantitative data are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean or standard deviation (SEM or SD).

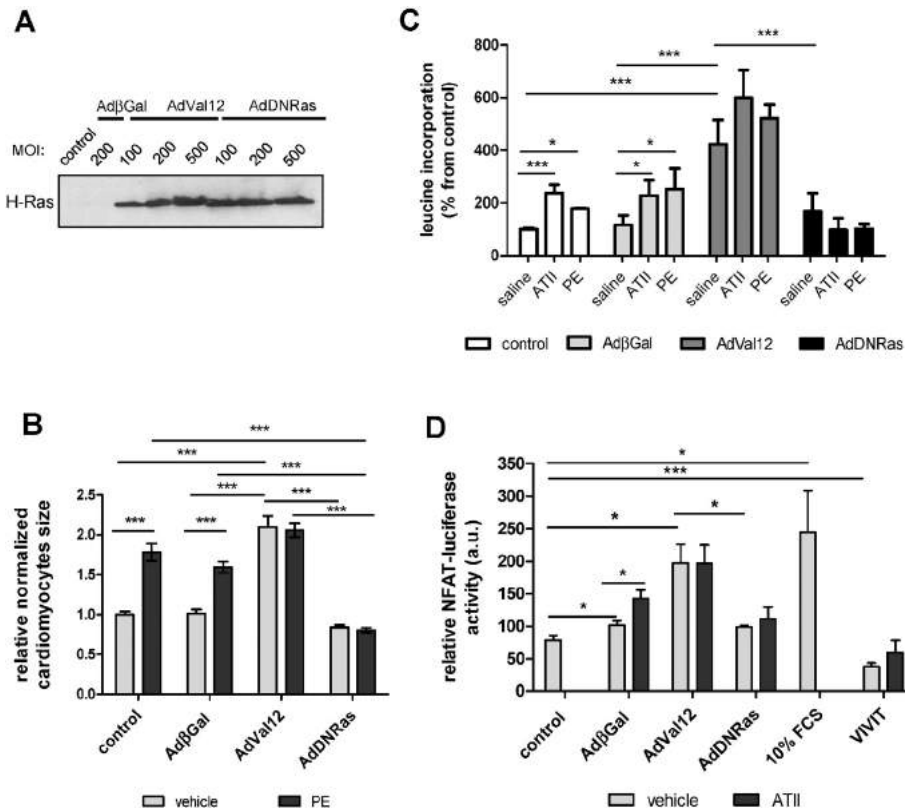
## 3. Results

### 3.1. Role of Ras in hypertrophic remodeling: a mixed agonist–antagonist effect of DN-Ras

We have examined the role of Ras in the hypertrophy-related signaling pathway using the neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) and adenovirus encoding either constitutively active H-Ras (Ad-Val12) or dominant negative (Ad-DNRas). The expression of Ras mutants in NRCM was demonstrated by immunoblot analysis (Fig. 1A). As shown in Fig. 1A, transducing NRCM with a different range of MOI (10 to 500 MOI per cell) resulted in similar expression increase of Ras protein (Fig. 1A).

Next, we analyzed the effect of different Ras mutants on hypertrophic growth of NRCM at baseline or with stimulation by PE (Fig. 1B). At baseline, a significant increase of cardiomyocyte area was observed only in NRCM transduced with Ad-Val12 (Fig. 1B). As expected, PE treatment (1  $\mu$ M, 48 h) resulted in a significant increase of cardiomyocytes size in non-infected or Ad- $\beta$ Gal transduced NRCM (Fig. 1B). However in Ad-Val12-transduced group, PE treatment did not produce any additional effect on cell size, suggesting that Ras-Val12 activity was sufficient to achieve the maximal hypertrophic response. Although DN-Ras had no effect on cardiomyocyte size at baseline, it significantly inhibited PE-induced (1  $\mu$ M, 48 h) hypertrophic growth of cardiomyocytes (Fig. 1B).

Since NRCM hypertrophy is associated with an increase in protein synthesis [30], we assessed the effect of Ras mutants on Leucine incorporation (Fig. 1C). As expected, Angiotensin-II (AT-II) and phenylephrine (PE) both increased Leucine incorporation compared with untreated



**Fig. 1.** Modulation of hypertrophic remodeling of NCRM by Ras mutants. **A.** Expression of Ras proteins in transduced NCRM. Representative immunoblot showing expression of H-Ras protein in NCRM transduced for 48 h with relevant adenoviruses at multiple ranges of MOI (Multiplicity of Infection). Expression of H-Ras was low to undetectable in non-transduced or  $\beta$ -gal transduced NCRM at this time of exposure. **B.** Modulation of cell size by Ras-mutants and Phenylephrine (PE) in NCRM. Relative cardiomyocyte size (cell area) of control or transduced with indicated adenovirus NCRM. Cells were cultured for 48 h with PE (1  $\mu$ M) or vehicle. Area values were normalized to area of control (nontransduced) NCRM. Number of cardiomyocytes measured for each condition was  $\sim$ 60 from three independent experiments. \*\*\* $p$  < 0.001. **C.** Modulation of protein synthesis ( $^3$ H]-Leucine incorporation) by Angiotensin-II (AT-II), Phenylephrine (PE) and Ras-mutants in NCRM. Bar-graph showing [ $^3$ H]-Leucine by NCRM under different conditions. NCRM were transduced with Ad- $\beta$ Gal, Ad-DNRas or Ad-RasVal12 for 48 h, and stimulated for 7 h with Phenylephrine (PE) (1  $\mu$ M) or Angiotensin-II (1  $\mu$ M) in the presence of [ $^3$ H]-Leucine. The data are presented as normalized mean  $\pm$  standard error (SEM) of three independent experiments performed in triplicate. \* $p$  < 0.05; \*\*\* $p$  < 0.001. **D.** Ras controls the major prohypertrophic transcription factor NFAT. Promoter-reporter assay of NFAT transcriptional activity. Twenty-four hours after transduction with Ad-NFAT-Luc, NCRM were infected with indicated Ad- $\beta$ Gal, Ad-Val12, Ad-DNRas or Ad-VIVIT for 48 h. Ad-VIVIT, encoding NFAT competing peptide VIVIT and GFP under CMV promoter and FCS (10%) were used as negative and positive controls, respectively. Data (mean values  $\pm$  SEM of at least three independent experiments) are expressed in relative luciferase units (RLU) as a percentage of value in Ad- $\beta$ Gal infected cells. \* $p$  < 0.05; \*\*\* $p$  < 0.001.

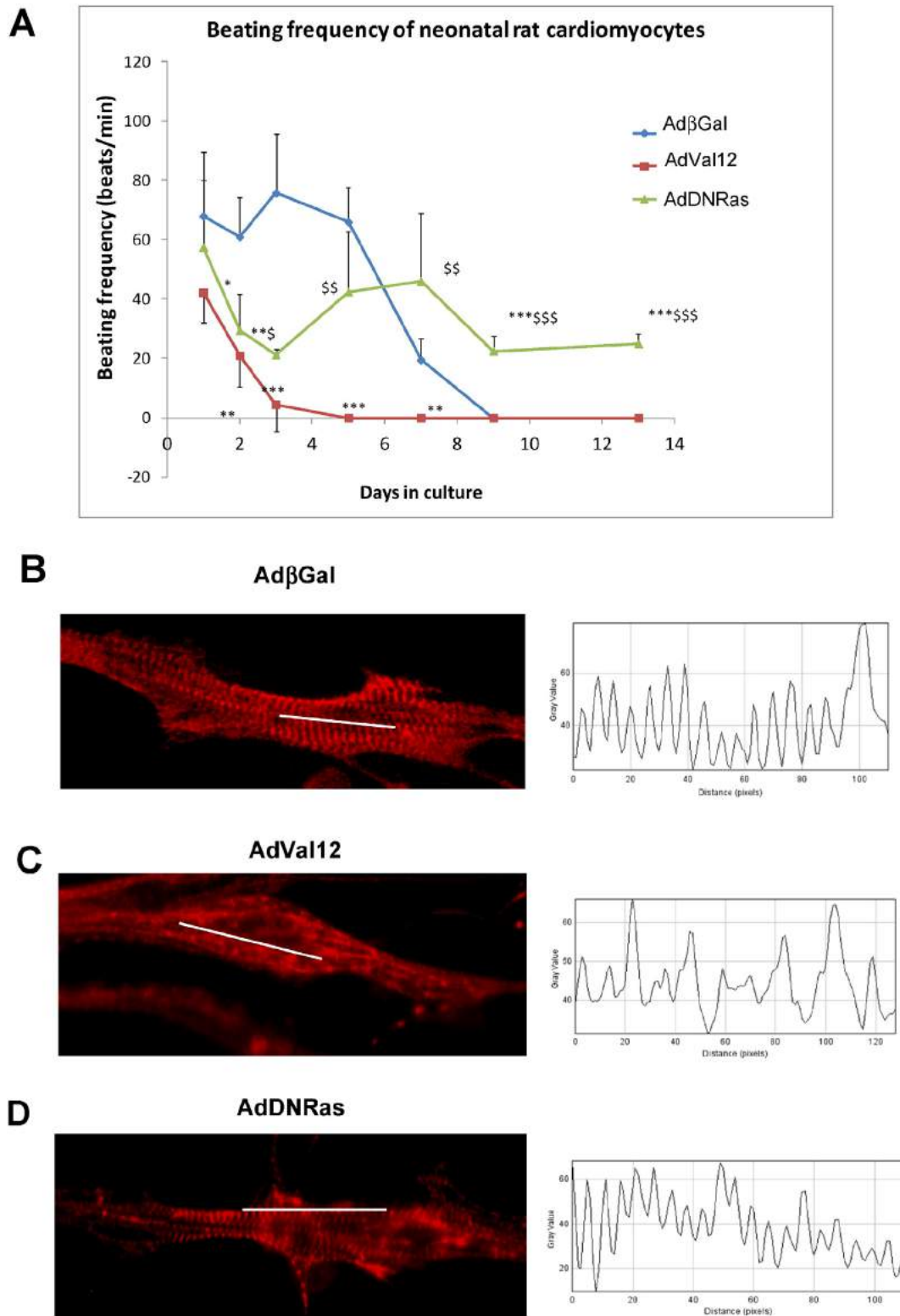
conditions (no virus or  $\beta$ -Gal groups). Interestingly, DN-Ras has no significant effect on Leucine incorporation at baseline, while it prevented the increase in protein synthesis when cells were stimulated with AT-II or PE, in contrast with all other groups. As expected, Ras-Val12 increased Leucine incorporation at baseline, and further increased it in stimulated states (Fig. 1C).

Then, in order to determine if Ras is involved in the control of hypertrophy-related signaling pathways, we analyzed the effect of different Ras proteins on the transcriptional activity of NFAT, the main activator of pathological cardiomyocyte hypertrophy [31]. As demonstrated in Fig. 1D, NFAT-luciferase activity was increased in cardiomyocytes cultured in the presence of FCS (10%) and completely abolished in cardiomyocytes expressing the NFAT-competing peptide VIVIT, even in the presence of ATII, attesting to the specificity of the effect observed (Fig. 1D). The transduction with control adenovirus (Ad- $\beta$ Gal) had no significant effect on basal NFAT-luciferase activity (Fig. 1D), while the expression of Ras-Val12 was sufficient to induce a robust increase of NFAT transcriptional activity, even in the absence of other stimuli (Fig. 1D), confirming previous observations [32]. As expected, ATII, which is known to induce an increase in intracellular  $Ca^{2+}$  [33], thereby activating the  $Ca^{2+}$ -dependent cytosolic factor NFAT [34] significantly increased NFAT-luciferase activity in Ad- $\beta$ Gal transduced cells, but could not increase this activity further in AdVal12 transduced cardiomyocytes, suggesting that RasVal12 maximally activated NFAT at the basal

state (Fig. 1D). Remarkably, DNRas has no effect on basal NFAT-luciferase activity but prevents the increase in this activity in the presence of ATII (Fig. 1D), in agreement with its effect on protein synthesis (Fig. 1C).

### 3.2. Activation of Ras adversely affects NCRM

Because hypertrophic remodeling is associated with alteration of cardiomyocyte structure and contractility, more precisely reduced sarcomere shortening and impaired contraction [35], we examined the effect of Ras mutants on spontaneous beating and sarcomere structure of NCRM (Fig. 2). NCRM were transduced with either Ad-Val12 or Ad-DNRas or Ad- $\beta$ Gal (control); spontaneously beating cells were monitored in culture for 14 days. In control cells (transduced with Ad- $\beta$ Gal), the rate of spontaneously beating cells was high (60 beats/min) until Day 5 after transduction. Then, the beating rate decreased dramatically to total cell beating arrest at Day 9. In the cells transduced with Ad-Val12, the beat rate dramatically decreased shortly after transduction to near arrest at Day 3 and was significantly lower than controls (Fig. 2A). By contrast, in the cultures transduced with Ad-DNRas, the beating rate decreased after transduction (Day 2) but remained stable in the range of 20 to 40 beats/min until the end of experiment (Day 14). Thus, DN-Ras preserved NCRM beating, while Ras-Val12 abolished it, compared to control.



**Fig. 2.** Activation of Ras leads to sarcomeric disorganization and impaired beating in NRCM. **A.** Monitoring of spontaneous beating frequency in NRCM transduced with Ad-βGal, Ad-Ras-Val12 or Ad-DNRas during 14 days. Cells were transduced at Day 0.  $n = 4$  cells per time point and per condition. Both Ras-Val12 and DN-Ras were compared to Beta-Gal with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  and DN-Ras was compared to Ras-Val12 with \$ $p < 0.05$ , \$\$ $p < 0.01$  and \$\$\$ $p < 0.001$ . **B, C and D.** Analysis of sarcomeric structure of NRCM transduced with Ad-βGal (**B**); Ad-Ras-Val12 (**C**) or Ad-DNRas (**D**) for 3 days. Left panel: immunofluorescence with α-Actinin showing the position of the Z-band. Right panel: profile showing the optical density (gray plot) along the white line. Images show the representative pattern observed in at least 60% of the cells. Magnification 40 $\times$ .

To determine whether the loss of beating was related to structural disorganization, we analyzed the effect of Ras mutants on α-actinin accumulation in Z-lines. It is known that *i*) α-actinin cross-links sarcomeric actin to Z-disk proteins; and *ii*) accumulation of α-actinin in the

Z-disk depends on its phosphorylation [36] and *iii*) Ras-Val12 impairs sarcomeric structure [9].

Immunofluorescence with anti-α-actinin revealed a strong sarcomeric organization in control non-infected (not shown) or Ad-βGal

infected cardiomyocytes (Fig. 2B). However gene transfer of Ras-Val12 decreased  $\alpha$ -actinin accumulation in Z-disks suggesting disorganization of sarcomere structure (Fig. 2B). Interestingly, when NRCM were transduced with DN-Ras, the  $\alpha$ -actinin accumulation to Z-disk was preserved (Fig. 2B), suggesting normal sarcomeric organization. Thus, expression of constitutive active Ras (Ras-Val12) resulted in impaired cardiomyocyte beating supported by loss of  $\alpha$ -actinin accumulation in Z-disk leading to sarcomeric disorganization.

### 3.3. Differential modulation of ERK and RAF phosphorylation by Ras mutants

The mechanism of action of DN-Ras was analyzed in the Ras-related pathway, specifically ERK phosphorylation modulation by Ras mutants when the NRCM were stimulated with AT-II or PE (1  $\mu$ M, 10 min) (Fig. 3). Both AT-II and PE significantly increased ERK phosphorylation in NRCM (Fig. 3A&B). As expected, Ras-Val12 greatly increased ERK phosphorylation in the basal state and this activation is maintained under either stimulus (PE or AT-II) (Fig. 3A). By contrast, at basal state DN-Ras did not affect ERK phosphorylation (Fig. 3B). Moreover, DN-Ras expression prevented the increase of ERK phosphorylation under AT-II treatment (Fig. 3B). However, DN-Ras did not prevent ERK

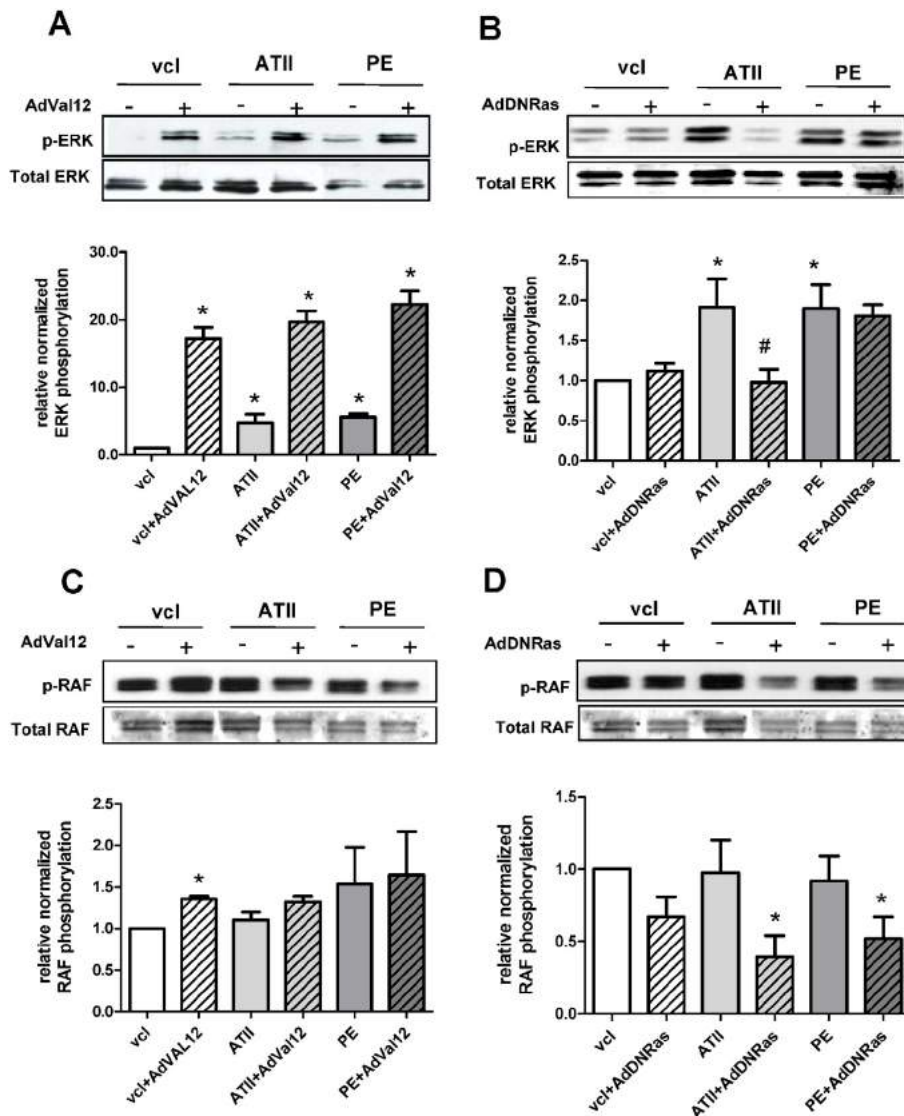
phosphorylation when activated by PE (Fig. 3B), indicating a stimulus-dependent antagonist activity of DN-Ras.

We also examined the modulation of RAF phosphorylation under the same conditions. Indeed, RAF is currently considered as a first downstream signaling molecule in RAS signaling cascade [37]. Surprisingly, AT-II and PE treatment only mildly increased RAF phosphorylation in NRCM (Fig. 3C&D). Along with this, Val-12 had a modest effect on RAF phosphorylation under basal conditions and did not affect Raf under PE or AT-II stimulation (Fig. 3C). Regarding the effect of DN-Ras on RAF, it mildly reduces RAF under AT-II and PE stimulation (Fig. 3D).

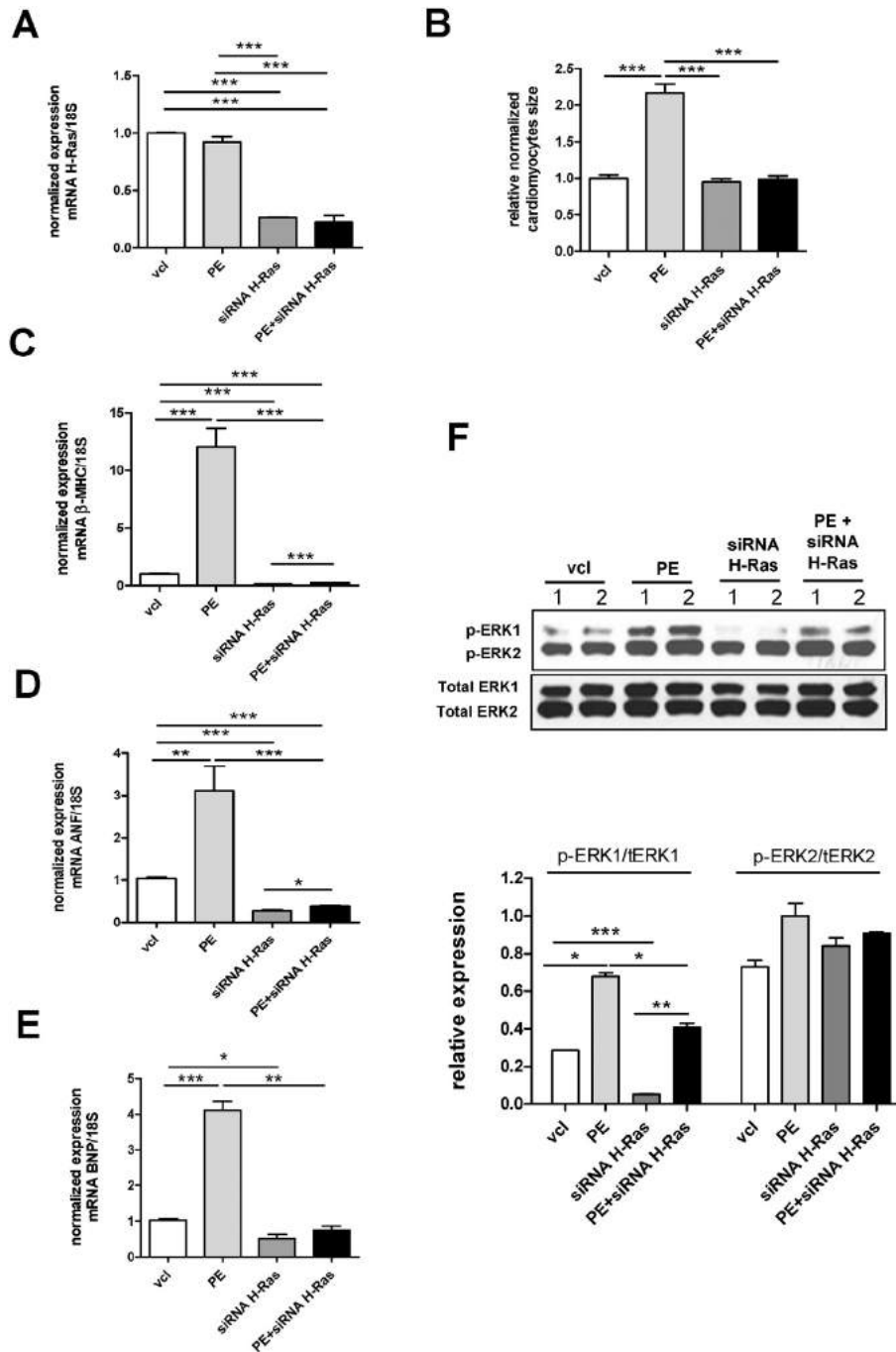
In summary, our *in vitro* data show that the expression of constitutive active Ras mutant is sufficient for induction of hypertrophic remodeling through NFAT activation. Dominant negative Ras has no effect on transcriptional activation of NFAT, but exert a mixed agonist–antagonist effect depending on the concurring hypertrophic stimulus.

### 3.4. Effect of siRNA-HRas on NRCM hypertrophy

Since the experiments involving dominant negative or activating Ras mutants required the over-expression of the mutant, and in



**Fig. 3.** Modulation of ERK (A and B) and RAF (C and D) phosphorylation by Ras mutants under AT-II or PE stimulation. Upper panel: typical immunoblot showing relative levels of phosphorylation of ERK and Raf proteins at the basal conditions or under stimulation by AT-II (1  $\mu$ M, 10 min) or PE (1  $\mu$ M, 10 min). Lower panel: bar-graph showing the relative expression of the same proteins. Data (mean values  $\pm$  SEM of at least three independent experiments) are expressed as a percentage of value in control condition (non infected, non treated). \* $p < 0.05$ .



**Fig. 4.** Impact of siRNA-H-Ras treatment on phenylephrine-induced hypertrophy in NRCM. A. Normalized expression of the H-Ras mRNA; N = 3 per condition, *t*-test performed on the delta-delta-Ct. B. NRCM size after treatment with siRNA-H-Ras and/or PE. N = 84 to 122 cells per conditions were measured. C, D and E. Normalized expression of the mRNA of  $\beta$ MHC, ANF and BNP; N = 2–3 per condition, *t*-test performed on the delta-delta-Ct. F. Western blot and band quantification of the phosphorylation of ERK1 and ERK2; N = 2 bands per condition. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01 and \*\*\**p* < 0.001.

order to dissect more deeply the Ras-dependence and the Ras-independence of the hypertrophic phenotype under study, we sought to corroborate our results with those of a silencing strategy using siRNA-HRas (Fig. 4). The successful knockdown of H-Ras mRNA in NRCM under both unstimulated and PE-stimulated conditions by siRNA-HRas treatment was attested by the quantitative real time RT-PCR analysis (Fig. 4A). Knockdown of H-Ras by siRNA-HRas did not affect NRCM size at baseline but prevented the increase in NRCM size induced by PE (Fig. 4B). Interestingly, siRNA-HRas suppressed the baseline expression of the mRNA of  $\beta$ -MHC, ANF and BNP in NRCM (Fig. 4C–E). The expression of these 3 genes markedly

increased under PE stimulation, and this increase was blunted by the addition of siRNA-HRas (Fig. 4C–E). Nevertheless, PE retained a modest but significant stimulatory effect on the expression of  $\beta$ -MHC and ANF in the presence of siRNA-HRas (Fig. 4C–E), suggesting the parallel activity of Ras-dependent and Ras-independent mechanisms. A similar pattern was observed for the phosphorylation of ERK1, which was reduced by siRNA-HRas at baseline and stimulated by PE (Fig. 4F). The phosphorylation of ERK1 was still increased by PE in the presence of siRNA-HRas, however, this increase was blunted (Fig. 4F). PE and Ras siRNA did not significantly affect ERK2 phosphorylation (Fig. 4F).



In vivo, the alteration of hemodynamic load results in the activation of multiple neurohormonal responses and intracellular signaling pathways involved in the regulation of cardiac myocyte size and function. Thus, we hypothesized that in vivo modulation of intracellular signaling by Ras mutants results in differential adaptation of heart function to pressure overload. Therefore, we have analyzed the effect of Ras mutants on cardiac remodeling in a left ventricle (LV) pressure overload hypertrophy (POH) model.

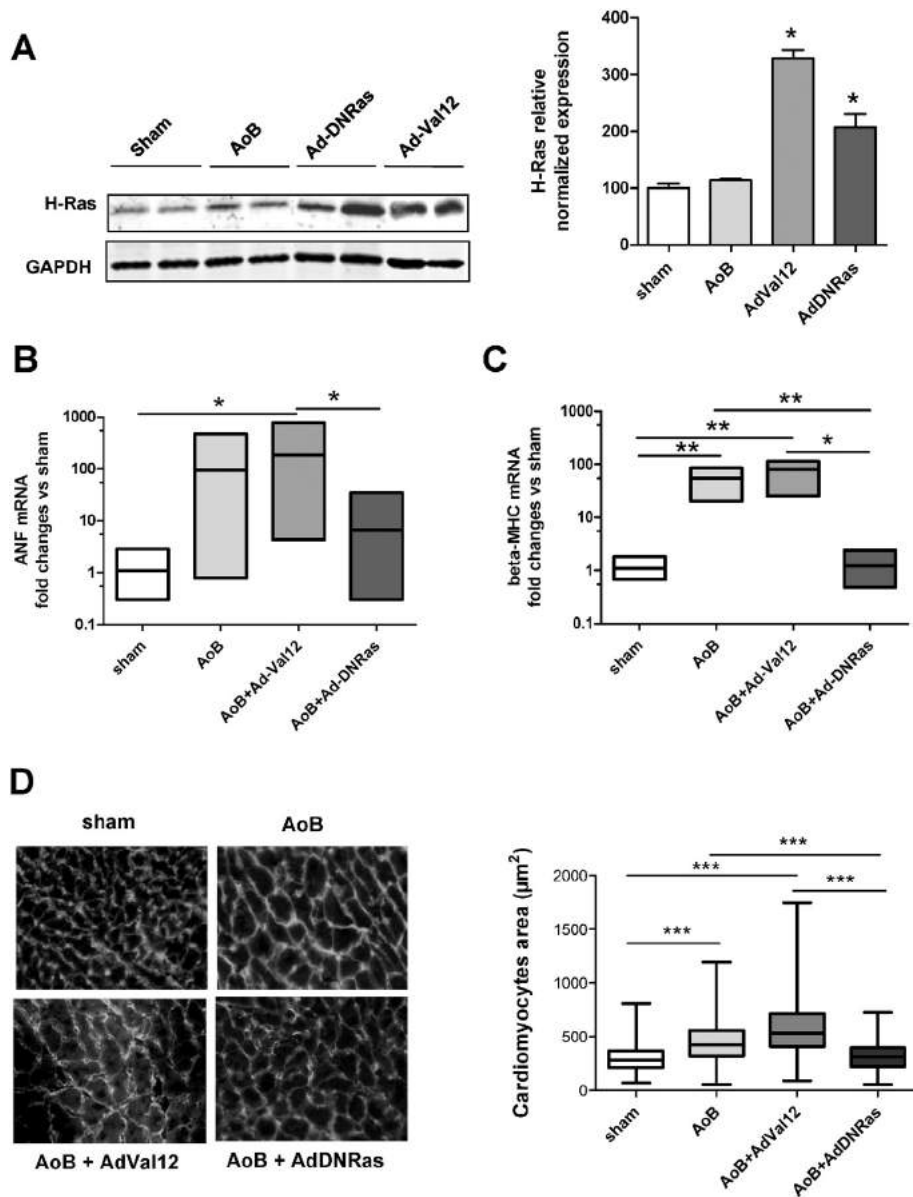
3.5. Concurrent effect of Ras mutants and pressure-overload on early cardiac hypertrophy

Pressure-overload hypertrophy (POH) was induced in rats by aortic banding simultaneously with the gene transfer of Ras mutants. The

animals were sacrificed 2 weeks after surgery. Effective gene transfer was verified by the increase in protein expression of Ras (Fig. 5A). Since there are no specific antibodies against Ras mutants, increased total Ras protein (H-Ras) expression indicated effective gene transfer (Fig. 5A).

3.5.1. DN-Ras prevented the pathologic hypertrophic remodeling of cardiomyocytes in the setting of POH

mRNA expression of hypertrophy-related genes was analyzed in LV tissue with POH with and without gene transfer of Ras mutants (Fig. 5B&C). As expected, POH increased the mRNA of ANF and  $\beta$ -MHC in LV tissue. Constitutively active Val12Ras further augmented the expression of hypertrophy-related genes in LV of POH animals (Fig. 5B&C). By contrast, DN-Ras prevented the increase of expression



**Fig. 5.** Impact of Ras gene transfer on left ventricular pressure-overload hypertrophy. A. Representative immunoblot (left panel) and quantification (right panel) showing H-Ras expression in LV of control animals or animals transduced with indicated virus. n = 2 per group, \*p < 0.05. B&C. Box plots of the RT-PCR analysis of the relative mRNA expression of hypertrophic markers (ANF (B) and beta-MHC (C)) in LV tissue from control animals or POH animals transduced with indicated virus. All the groups were normalized versus the levels of 18S mRNA. N = 2–3 animals per group. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01 for t-test performed on the delta-delta-Ct. D. Analysis of LV cardiomyocyte cross-sectional area in control (sham operated) and POH animals transduced with indicated adenovirus. Left panel: Germ agglutinin staining. Right panel: Bar graph representing the mean cardiomyocytes cross-sectional area in 3 sham- and 4 POH-operated animals. 250 individual measurements from 5 sections were performed for each animal. \*\*\*p < 0.001 (Non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s Multiple Comparison Test).

of both ANF and  $\beta$ -MHC in LV of POH animals suggesting a cardio-protective effect. We have measured the cross-sectional area of LV cardiomyocytes. As expected, POH significantly increased the size of cardiomyocytes in LV tissue (Fig. 5D). Expression of Val12Ras further enlarged the cardiomyocytes size as well as cardiomyocytes size variance in the setting of POH. Conversely, in DN-Ras transduced animals, the size of LV cardiomyocytes was similar to that in sham-operated animals (Fig. 5D), demonstrating the efficacy of inhibition of Ras signaling pathway by DN-Ras in early cardiac hypertrophy.

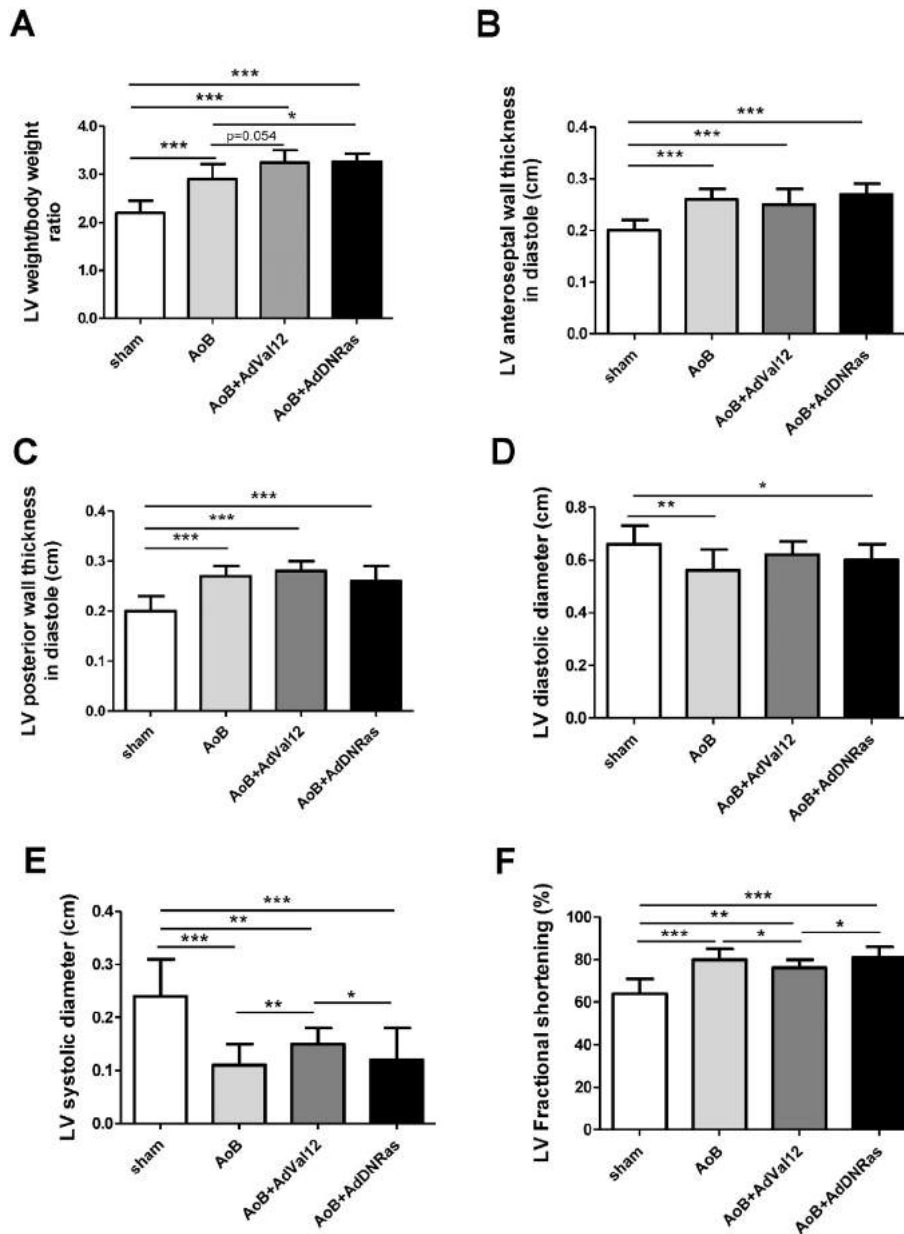
### 3.5.2. Both Ras-Val12 and DN-Ras increase LV/body weight ratio in the setting of POH

Two weeks after POH surgery, both Ras mutants appeared to exert a pro-hypertrophic effect as indicated by the ratio of LV/body weight, significantly higher than the AoB-saline control (Fig. 6A, Table 1). This

finding is compatible with a partial agonist effect of DN-Ras on LV hypertrophy per se in the setting of POH. However, it comes with a trend to a higher LV weight and to a lower body weight in DN-Ras-transduced POH animals compared to saline control POH (Table 1). Ras mutants did not significantly affect the increase in LV wall thickness associated with POH (Fig. 6B&C, Table 1).

### 3.5.3. Ras-Val12 gene transfer increases LV systolic diameter and reduces LV fractional shortening compared to DN-Ras in the setting of pressure overload

LV diameters and fractional shortening were examined to test the hypothesis that, at similar levels of hypertrophy, Ras mutants had a different impact on LV function. As expected in a concentric LV hypertrophy pattern, LV diastolic diameters were reduced (compared to sham) in POH rats injected with saline and after DN-Ras gene transfer; this reduction was not significant after Ras-Val-12 gene transfer (Fig. 6D,



**Fig. 6.** Morphometric and Echocardiographic analysis of rat LV in the setting of combined POH and Ras mutant gene transfer. 7–13 animals per group were analyzed (see Table 1 for details). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . A. Morphometric analysis. LV weight/body weight is increased as a result of POH, and further increased by gene transfer of either DN-Ras or Val12-Ras. AoB, ascending aortic banding. B&C. LV anteroseptal (B) and posterior (C) wall thickness were increased significantly in all POH groups. No significant difference was related to Ras mutants. D. LV diastolic diameter at 2 weeks was reduced by AoB with saline or DN-Ras, but failed to decrease with Ras-Val12. E. LV systolic diameter was reduced in all POH groups; it was significantly increased in the Val12-Ras group compared to other POH. F. LV fractional shortening increased in POH as a result of concentric LV hypertrophy; it was significantly reduced with Val12-Ras gene transfer compared to other POH.

**Table 1**

Echocardiographic and morphometric analysis of the left ventricle (LV) after pressure overload hypertrophy (POH) and H-Ras mutants gene transfer (a) LV and body weight (BW) (b) LV diastolic wall thickness (c) LV cavity diameter and fractional shortening. SD, standard deviation.

(a) LV and body weight (BW)					
Group		BW (g)	BW (g)	LVweight (mg)	LVweight/BW (mg/g)
Timepoint		Baseline	2 weeks	2 weeks	2 weeks
Sham	Mean	289.00	391.23	869.78	2.20
	SD	30.39	33.60	84.86	0.25
	n	7	13	9	9
AAB + saline	Mean	285.00	382.67	1120.50	2.93
	SD	29.31	30.74	142.52	0.34
	n	3	6	6	6
AAB + DN-Ras	p vs. Sham	0.85	0.6	0.0009	0.0003
	Mean	274.83	367.10	1221.43	3.27
	SD	39.03	32.41	42.06	0.16
AAB + Ras-Val12	n	6	10	7	7
	p vs. Sham	0.47	0.098	<0.0001	<0.0001
	p vs. AAB + saline	0.71	0.36	0.0999	0.0401
AAB + Ras-Val12	Mean	270.40	336.30	1108.44	3.25
	SD	28.70	33.31	151.85	0.25
	n	10	10	9	9
AAB + Ras-Val12	p vs. Sham	0.22	0.0008	0.0008	<0.0001
	p vs. AAB + saline	0.46	0.015	0.89	0.054
	p vs. AAB + DN-Ras	0.80	0.0505	0.0780	0.91

(b) LV diastolic wall thickness					
Group		LV anteroseptal wall thickness in diastole (cm)	LV anteroseptal wall thickness in diastole (cm)	LV posterior wall thickness in diastole (cm)	LV posterior wall thickness in diastole (cm)
Timepoint		Baseline	2 weeks	Baseline	2 weeks
Sham	Mean	0.19	0.20	0.20	0.20
	SD	0.02	0.02	0.03	0.03
	n	13	13	13	13
AAB + saline	Mean	0.19	0.26	0.20	0.27
	SD	0.01	0.02	0.02	0.02
	n	6	7	6	7
AAB + DN-Ras	p vs. Sham	0.76	<0.0001	0.74	<0.0001
	Mean	0.19	0.27	0.20	0.28
	SD	0.02	0.02	0.03	0.02
AAB + DN-Ras	n	10	10	10	10
	p vs. Sham	0.98	<0.0001	0.79	<0.0001
	p vs. AAB + Saline	0.76	0.97	0.92	0.446
AAB + Ras-Val12	Mean	0.17	0.25	0.18	0.26
	SD	0.01	0.03	0.02	0.03
	n	10	10	10	10
AAB + Ras-Val12	p vs. Sham	0.033	0.0004	0.086	0.0001
	p vs. AAB + Saline	0.0046	0.19	0.031	0.306
	p vs. AAB + DN-Ras	0.028	0.12	0.039	0.10

(c) LV cavity diameter and fractional shortening							
Group		LV diastolic diameter (cm)	LV diastolic diameter (cm)	LV systolic diameter (cm)	LV systolic diameter (cm)	LV Fractional shortening (%)	LV Fractional shortening (%)
Timepoint		Baseline	2 weeks	Baseline	2 weeks	Baseline	2 weeks
Sham	Mean	0.58	0.66	0.20	0.24	67	64
	SD	0.06	0.07	0.07	0.07	10	7
	n	13	13	13	13	13	13
AAB + saline	Mean	0.61	0.55	0.21	0.10	65	81
	SD	0.05	0.09	0.05	0.02	5	3
	n	6	7	6	7	6	7
AAB + DN-Ras	p vs. Sham	0.28	0.008	0.71	0.0001	0.79	<0.0001
	Mean	0.58	0.60	0.18	0.12	69	81
	SD	0.05	0.06	0.06	0.03	8	5
AAB + DN-Ras	n	10	10	10	10	10	10
	p vs. Sham	0.93	0.041	0.46	<0.0001	0.50	<0.0001
	p vs. AAB + saline	0.25	0.19	0.24	0.29	0.33	0.89
AAB + Ras-Val12	Mean	0.59	0.62	0.19	0.15	68	76
	SD	0.07	0.05	0.06	0.03	7	4
	n	10	10	10	10	10	10
AAB + Ras-Val12	p vs. Sham	0.64	0.12	0.87	0.0013	0.76	0.003
	p vs. AAB + saline	0.62	0.06	0.55	0.0018	0.48	0.0146
	p vs. AAB + DN-Ras	0.69	0.44	0.52	0.013	0.65	0.02

Table 1). Likewise, LV systolic diameters were reduced in all 3 POH groups, however, LV systolic diameters were significantly higher with Ras-Val12 gene transfer than with either saline or DN-Ras (Fig. 6E,

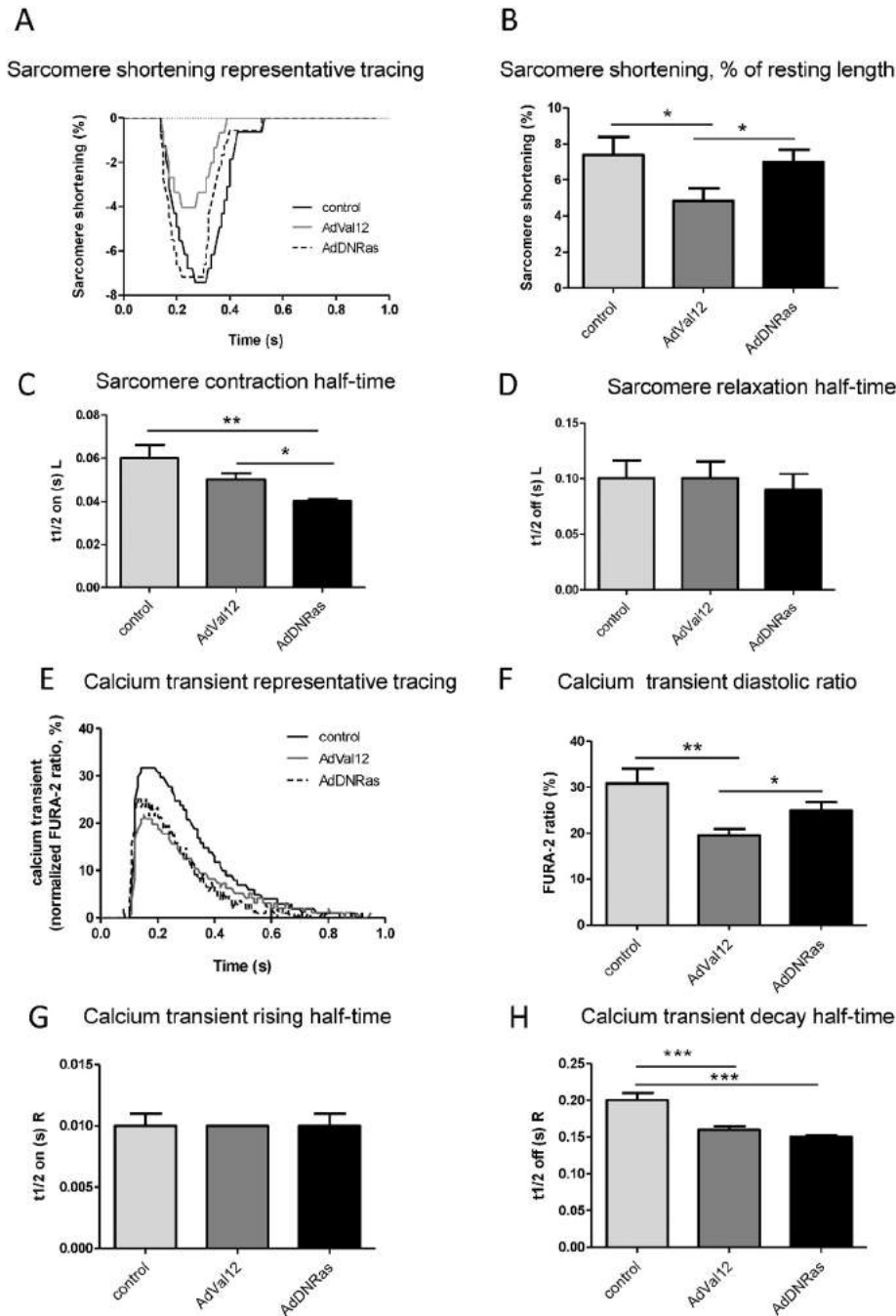
Table 1). Similarly, concentric POH resulted in an increase in LV fractional shortening; however, fractional shortening was lower in Ras-Val12 compared to DN-Ras and saline (Fig. 6F, Table 1). Altogether, these

data corroborate the cardiotoxicity of Val12-Ras beyond hypertrophy, and a possible cardioprotective effect of DN-Ras consistent with what we observed in NRCM.

### 3.5.4. Ras-Val12 gene transfer alters cardiomyocytes contractility and calcium transients compared to DN-Ras in the setting of pressure overload

Our findings in Fig. 2 further demonstrate a known cardiotoxic effect of Ras-Val-12 on NRCM, in agreement with previous reports [9], and suggest a cardioprotective effect of DN-Ras. Moreover, both Ras mutants differentially affect contractile function and cardiac hypertrophy in POH

(Fig. 6, Table 1). Based on these results, we examined the effects of ras mutants on adult cardiomyocyte contractility and  $Ca^{2+}$  handling in the setting of POH. Ventricular myocytes were isolated from rats two weeks after simultaneous aortic banding surgery and gene transfer; subsequently, cardiomyocyte contractility and calcium transients were evaluated as described in the Methods section. Fig. 7A shows recordings from representative control ventricular myocytes (sham operated) and POH myocytes infected with either AdVal12 or AdDN-Ras. Interestingly, AdVal12 overexpression induced significant decreases in cell shortening compared to AdDN-Ras ( $4.83 \pm 0.71\%$ ,  $n = 17$  vs.  $7.0 \pm 0.66\%$ ,  $n = 11$ ;



**Fig. 7.** Effects of Ras mutants on adult rat cardiomyocyte contractility and  $Ca^{2+}$  transients in the setting of POH. A, Representative tracings of sarcomere shortening from control myocytes and myocytes subjected to 2 weeks of POH and simultaneously transduced with Ad.Val12 or Ad.DN-Ras in vivo. B, Sarcomere shortening, as a % of resting cell length. C, Time to Half Contraction (t1/2 on (s) L). D, Time to Half Relaxation (t1/2 off (s) L). L—length of cardiomyocytes; E, representative  $Ca^{2+}$  transient tracings. F,  $Ca^{2+}$  transient, diastolic ratio. G, Calcium transient rising half-time (t1/2 on (s) R). H, Calcium transient decay half-time (t1/2 off (s) R). R—FURA-2 340/380 ratio. Average parameters of cardiomyocyte contraction were determined (control:  $n = 9$ ; Ad.Val12,  $n = 17$ ; AdDN-Ras,  $n = 11$  cells); average of calcium transient parameters were determined (control:  $n = 17$ ; Ad.Val12,  $n = 23$ ; AdDN-Ras,  $n = 13$  cells) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

$p < 0.05$ , Fig. 7B). Moreover, contraction half-time was shortened, indicating that contraction was accelerated in DN-Ras overexpressing cardiomyocytes ( $t_{1/2 \text{ on(s)L}} = 0.05 \pm 0.003 \text{ s}$  for AdVal12,  $n = 17$  vs.  $0.04 \pm 0.001 \text{ s}$  for AdDN-Ras,  $n = 11$ ;  $p < 0.05$ , Fig. 7C). Relaxation half-time was unchanged between mutants ( $t_{1/2 \text{ off (s)L}} = 0.1 \pm 0.015 \text{ s}$ ,  $n = 17$  vs.  $0.09 \pm 0.014 \text{ s}$ ,  $n = 11$ ;  $p = \text{NS}$ , Fig. 7D). These adult myocyte mechanical abnormalities are consistent with what has been observed in NRCM (Fig. 2) and alteration of ventricular function in vivo (Fig. 6, Table 1).

To evaluate whether the observed effect of Val12 on myocytes contractility is due to its effects on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling, cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  transients were determined in FURA-2 loaded ventricular myocytes.  $\text{Ca}^{2+}$  transients following POH and AdVal12 overexpression were reduced ( $19.46 \pm 1.45\%$ ,  $n = 17$ ) compared to either control ( $30.89 \pm 3.19\%$ ,  $n = 17$ ;  $p < 0.01$ ) or AdDN-Ras-transduced myocytes ( $22.96 \pm 2.01\%$ ,  $n = 13$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 7E and F). There was no effect on the rising half-time of the calcium transient (Fig. 7G); however, the half-time of calcium transient decay was accelerated only in the DN-Ras group (Fig. 7H).

## 4. Discussion

### 4.1. Central role of Ras in physiologic and/or pathologic cardiomyocyte hypertrophy

Pathologic cardiomyocyte hypertrophy is the result of a complex interaction between signaling pathways leading to a manifold response beyond myocyte growth [5,31]. This interaction likely results in an equilibrium, which is in turn displaced by the addition of Ras mutants, variably affecting hypertrophy and some of its aspects. Cardiomyocyte hypertrophy is not limited to an increase in cell size but is rather a multifactorial process involving transcriptional events, new protein synthesis, and changes in the myofilament organization [12,31].

Previous reports indeed suggest that Ras mutants have mixed agonist and antagonist effects on cardiac hypertrophy which are modulated by concurring hypertrophic stimuli: Gottshall et al. [7] mentioned significant variability of phenotype among Ras-Val12 transgenic mice; one explanation for this variability within and between studies may reside in the fine balance on which the Ras system operates and the easy displacement of the Ras equilibrium.

Here, we demonstrated a cardio-protective effect of DN-Ras beyond its variable antihypertrophic effect using in vitro and in vivo gene transfer studies. In vitro, DN-Ras maintains NRCM beating and enhances Z line structure, is antihypertrophic on NRCM activated by PE, and inhibits NFAT. In vivo, DN-Ras decreased the expression levels of  $\beta$ -MHC and ANF in hypertrophied hearts and reduced the cross-sectional area of cardiac myocytes. Furthermore, DN-Ras enhances contractility and ameliorates  $\text{Ca}^{2+}$  transient in cardiomyocytes in the setting of POH, in comparison to the detrimental effects of Ras-Val12. In a previous study, Ras-Val12 mutants impaired calcium transients in NRCM [9].

Taken together, our data show that the Ras signaling cascade can be involved in physiological and/or pathological adaptations of cardiomyocyte structure and function to altered haemodynamics, depending on stimuli combination (Fig. 8). Physiological adaptation can be achieved through modulation of the RAS/RAF/ERK signaling pathway; whereas pathological remodeling requires the activation of the transcription factor NFAT [38,39]. Indeed, the expression of a constitutively active Ras mutant induced transcriptional activation of NFAT, sarcomeric disorganization and cardiac dysfunction.

Dominant negative Ras inhibits the agonist-induced transcriptional activation of NFAT, but allows ERK phosphorylation under particular conditions. Furthermore, the mixed agonist–antagonist effect of DN-Ras is dependent on the concurring hypertrophic stimuli.

Our study of the effect of Ras mutants on cardiomyocyte hypertrophy shows for the first time that a known DN-Ras mutant (Ras N17) can allow physiological hypertrophy to occur, while it is antihypertrophic

under classical ligand stimulation, favoring a mixed agonist–antagonist response rather than a mere competitive antagonism. This evidence highlights the difference within signaling pathways activated during pathological and physiological remodeling. The mixed agonist and antagonist actions of DN-Ras, as well as the agonist actions of active Val-12 Ras are stimulus-dependent. This behavior suggests that Ras does not have a simple switch on-off function but a highly complex role of modulation, depending on the stimulus, as highlighted by the varied responses of cardiomyocytes to Ras mutants in our experiments. Besides, we studied the differential action of Ras mutants beyond mere hypertrophy, affecting sarcomeric organization in vitro, the pathologic character of LV hypertrophy and ensuing LV and cardiomyocyte function in the setting of POH in vivo.

### 4.2. Pathologic prohypertrophic effect of active Ras-Val12

#### 4.2.1. Cardio-toxicity of Val12-Ras in vitro

Here we have demonstrated that Ras-Val12 gene transfer to NRCM caused sarcomeric disorganization and inhibited the beating of cardiomyocytes, consistent with the finding of Ho et al. [9]. Unlike us, Thorburn et al. [10] found that Ras-Val12 increased the organization of sarcomeres similarly to PE. Differences in the promoter used may explain the different results, since, in our study, Ras-Val-12 was overexpressed through a CMV promoter, while in the study by Thorburn et al. Ras-Val12 was overexpressed using its native Ras promoter [10].

We suggest that the cardio-toxicity of Val12-Ras could be related to the involvement of active Ras in the transcriptional activation of the pro-hypertrophic transcription factor NFAT. Indeed, as demonstrated here, the expression of the constitutive active Ras mutant was sufficient to activate NFAT in the absence of other stimuli. In relation with this, Ras-Val12 abolished NRCM beating within a few days after gene transfer, whereas, DN-Ras maintained their beating for a longer time than controls. This result, together with the enhancement of the sarcomeric structure by DN-Ras, strongly suggests not only a pro-hypertrophic effect of Ras-Val12 but also a cardiotoxic one, while DN-Ras shows cardio-protective properties despite a mixed-agonist–antagonist effect on hypertrophy.

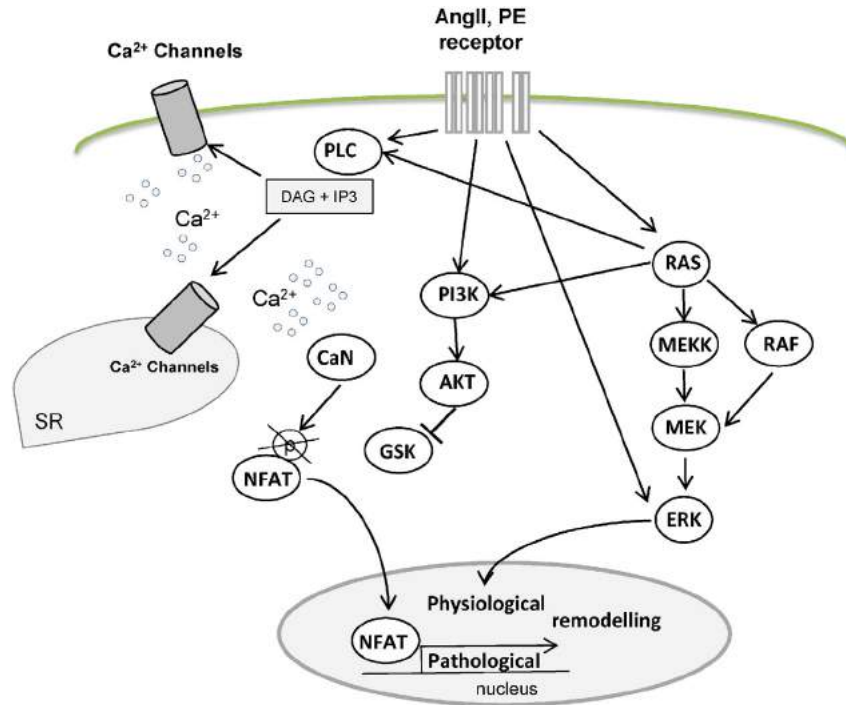
#### 4.2.2. Effects of Val12-Ras in vivo in the setting of POH

Previously, Hunter J. et al. [17] have reported that Ras-Val12 induced left ventricular hypertrophy with myocyte disarray and diastolic dysfunction in transgenic mice; however, echocardiography was not performed in the latter study, therefore, LV geometry was not determined. Another study by the same group [7] in echocardiography-selected transgenic mice demonstrates concentric LV hypertrophy with increased wall thickness, intraventricular obstruction and reduced fractional shortening in Ras-Val12 mice. In contrast, our study of the added effect of Ras-Val12 gene transfer on POH by ascending aortic banding demonstrates a more eccentric hypertrophy associated with a significant increase in LV end-systolic diameter and a trend to reduce LV wall thickness along with the previously demonstrated [7] reduced fractional shortening. In addition, data from our study revealed that POH ventricular myocytes transduced with Ras-Val12 exhibited depressed sarcomeric shortening and depressed calcium transients compared to healthy cardiomyocytes and POH cardiomyocytes overexpressing DN-Ras, confirming the cardiotoxic effect of Ras-Val12 in vivo.

### 4.3. DN-Ras as a mixed agonist–antagonist of cardiomyocyte hypertrophy

#### 4.3.1. Comparison of DN-Ras N17 with other DN-Ras mutants

Our study shows that active and dominant-negative Ras mutants differentially affect the different aspects of hypertrophy. Ras has been shown to modulate NFAT activation in NRCM, with induction by Val-12-Ras and inhibition of agonist-induced NFAT activation by N17-DNRas [32]. In our experiments, Val-12 Ras activated NFAT without concurring stimulation, whereas DN-Ras had no effect on NFAT activity in



**Fig. 8.** Simplified schema showing the intracellular signaling pathways modulated by Ras in cardiomyocytes (adapted from Diana E. Jaalouk & Jan Lammerding, [45]). At the level of cardiomyocytes, hemodynamic alterations and neurohormonal ligands can be sensed through a diverse group of membrane-anchored mechanosensors including ion channels, cell-membrane-spanning G-protein-coupled receptors, and growth-factor receptors. This mechanical sensing is then converted to biochemical signals by triggering the multi-step activation of downstream partners in an array of signaling cascades in the cytoplasm. The highlights of such cascades include the three modules of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family underscored by the activation of Ras, the PLC-related cascade leading to the alteration of Ca<sup>2+</sup> signaling and PI3K signaling cascade required for the induction of hypertrophic remodeling. The convergence of these pathways results in the activation of specific transcription factors including the nuclear factor of activated T cells (NFAT), involved in hypertrophic remodeling. Singular activation of ERK signaling (through RAF or directly by GPCR) seems to support adaptive physiological remodeling. Ultimately, the net sum of gene-expression reprogramming in cardiomyocytes dictates the structural and functional response of a cell to pressure overload.

basal conditions, but prevented the ATII-induced increase of NFAT-luciferase activity, confirming previous observations [32].

The effects observed with dominant negatives Ras mutants depend of the type of mutant. We used an N17 mutant employed also by other studies [12,15,40] whereas several studies employed the Ala15-Ras inhibitor [10,41]. The inhibitory action of DN-Ras-N17 is due to a reduced affinity for GTP and a normal affinity for GDP [18]. Interestingly, it has been noted that Ras mutants with reduced affinity for both GDP and GTP did not inhibit growth [18], suggesting that Ras mutations affecting GTP binding are more than a simple on-off switch and favoring our mixed agonist-antagonist hypothesis, balanced by the molecular context. Indeed, the actions of N17-DNRas are mediated by interaction with Ras-guanine nucleotide exchange factors (Ras-GEF) [5].

#### 4.3.2. Differential modulation of ERK and Raf by DN-Ras

The analysis of the classical Ras pathway showed that in NRCM stimulated by AT-II, DN-Ras blocked Raf and ERK phosphorylation; but when the NRCM were stimulated with PE, DN-Ras down-regulated Raf phosphorylation but did not block ERK phosphorylation, supporting a stimulus-dependent modulation of ERK by DNRas and PE. This observation is consistent with Lei et al. who found that PE activates ERK by trans-activating EGFR and FGFR (Epidermal and Fibroblast Growth Factor Receptors) independent of the Ras/Raf/ERK pathway [42], and is also consistent with the data from Duquesnes N et al. [15]. However these data contrast with the study of Zou et al. [40]. There are clear methodological differences between the two studies. For example, in the study by Zou et al. [40], pharmacologic inhibition of the farnesylation of Ras was used, and N17-DNRas was expressed using plasmids with 3–5% transfection efficiency, while our study used adenoviral vectors. Moreover, the study by Zou et al. [40] measured the phosphorylating activity of ERK and Raf-1 rather than the phosphorylation measured by us. Our data with AT-II and PE are of interest since they reveal a more potent

activation of ERK than of Raf-1, and the Ras-dependence of the activation of these targets by AT-II, but not by PE, for ERK. Thus, the blocking effect of DN-Ras can be overridden by alternative signaling pathways.

This fine regulation of DN-Ras that modulates ERK phosphorylation under AT-II but not under PE is a very important observation illustrating the mixed, apparently paradoxical, agonist-antagonist effect of DN-Ras found *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, active Ras-Val12 phosphorylated ERK strongly, but it increased phospho-Raf only slightly. DN-Ras did not block ERK and Raf as consistently as expected. A likely explanation is that the DN-Ras N17 mutant has a negative phenotype, but it is not a negative null type mutant: DN-Ras decreases the affinity of Ras for GTP from  $1 \times 10^{-8}$  to  $1 \times 10^{-6.5}$  [18], maintaining a relatively low but steady activation of Ras, permitted by the binding to GTP that activates Ras.

#### 4.3.3. Ras inhibition by siRNA-H-Ras as an alternative approach to N17-DN-Ras

Considering that the results obtained with DN-Ras were mitigated by the overexpression of a protein that was not a negative null mutant, we complemented our experiments by the study of the effects of siRNA-H-Ras transfection on NRCM. To our knowledge, this is the first study to use that approach. As shown in Fig. 4, siRNA-H-Ras inhibited PE-induced NRCM hypertrophy and blunted the PE-induced expression of hypertrophic markers as well as the PE-induced phosphorylation of ERK1. Interestingly, siRNA-H-Ras reduced the baseline expression of molecular markers of hypertrophy and the baseline phosphorylation of ERK1 (Fig. 4C–F). Moreover, PE had a significant stimulatory effect on  $\beta$ -MHC and ANF expression despite the presence of siRNA-H-Ras (Fig. 4C, D) along with the ability to induce the phosphorylation of ERK1 (Fig. 4F) suggesting an additive effect of Ras-dependent and Ras-independent mechanisms, especially for the agonist-induced phosphorylation of ERK.

#### 4.3.4. The complex effects of N17-DNRas on rat POH

Here, in contrast with a previous study by Pracyk JB et al. [12], we have demonstrated that DN-Ras transduction preserved the sarcomeric organization and beating in cultured NRCM, suggesting a cardioprotective effect of DN-Ras *in vitro*. In line with these findings on NRCM, adult ventricular myocytes subjected to simultaneous POH and transduction with DN-Ras exhibited sarcomere shortening similar to control and even accelerated contraction. Calcium transients in DN-Ras transduced cardiomyocytes did not differ significantly from control transients, while calcium transient decay was significantly accelerated.

When superimposed on POH, DN-Ras did not affect LV geometry nor did it inhibit LV hypertrophy; it indeed seemed to favor hypertrophy as assessed by LV/body weight ratio (Fig. 6A, Table 1). In addition, we have demonstrated that DN-Ras prevented the hypertrophic growth of cardiomyocytes *in vitro* and the POH-induced increase in cardiomyocyte cross-sectional area *in vivo*. There are a few possible explanations to the contrast between the data on cardiomyocyte cross-sectional area *in vivo* and LV weight/body weight. Body weights of rats at baseline were similar between groups (Table 1). At two weeks after surgery, body weight tended to be lower in DN-Ras than in saline or sham groups, but was significantly lower in Val-12 Ras, likely reflecting blunted weight gain associated with adenoviral injection (Table 1). Taken together, a trend to a higher LV weight for DN-Ras vs. saline and a trend to a lower body weight could explain the marginal increase in LV weight/body weight ratio for DN-Ras vs. saline (Fig. 6A, Table 1). We attribute body weight differences to the attenuation of weight gain by adenoviral infection.

Nonetheless, the analysis of the regulatory mechanisms of Ras *in vivo* showed that DN-Ras suppressed the induction of  $\beta$ -MHC and ANF by POH, while the latter remained increased with the transfection of Val-12-Ras, although not exacerbated by it. This lack of *in vivo* anti-hypertrophic effect of DN-Ras in POH can be explained mainly by the presence of Ras-independent pathways. Fig. 8 summarizes the intracellular signaling pathways modulated by Ras in cardiomyocytes. The Ras-independent pathways were suggested by *in vitro* experiments by Pracyk et al. [12] and others [40,42]. Pressure-overload induces the release of the prohypertrophic ligands endothelin, angiotensin and PE [16]. These ligands are prohypertrophic through Ras-dependent and Ras-independent pathways [14,41]. Besides, Duquesnes et al. have shown that N17-DN-Ras plasmid transfection inhibited ERK activation in NRCM at baseline but not under stretch [15]. Finally, our *in vitro* experiments of ERK and Raf phosphorylation show that DN-Ras can block ERK phosphorylation when the cardiac cells are stimulated by AT-II but not by PE. These Ras-independent pathways, together with the previously reported stimulus-dependent modulation of cardiomyocyte hypertrophy by DN-Ras, provide explanations to the lack of antihypertrophic effect of DN-Ras in the *in vivo* experiments involving POH. In addition, and as mentioned earlier, parallel Ras-dependent and Ras-independent mechanisms appear to be at work in the PE-induced phosphorylation of ERK1 (Fig. 4F).

#### 4.4. Limitations

Our study suffers limitations of conceptual and methodological nature. We used classical designs (NRCM, POH) to study a protein previously shown to affect cardiomyocyte hypertrophy; however, we went on to evaluate the functional consequences of Ras modulation in the setting of hypertrophy. Measurable POH after 2 weeks is indeed observed in this study and in previous studies [27,43]. Nevertheless, significant myocardial dysfunction following POH is best evaluated in longer studies, where significant ventricular dilatation and transition to heart failure can be observed. Such a study would require the use of adenoviral-associated virus for gene expression, while in the present study, we used adenoviral vectors and were limited by the 2 weeks duration of expression these vectors allow *in vivo* [44].

## 5. Conclusions

The present study is, to our knowledge, the first one to study Ras modulation in pressure-overload hypertrophy, and, in that setting, it showed DN-Ras to be cardio-protective, although it was not anti-hypertrophic. This lack of anti-hypertrophic effect can be explained by mixed agonist–antagonist effects of DN-Ras that are stimulus-dependent, and by the complexity of certain stimuli, such as pressure-overload. Furthermore, this cardio-protective effect of DN-Ras has some similarities with physiologic hypertrophy, especially the lower expression level of  $\beta$ -MHC and ANF, along with the improved sarcomere shortening and calcium-handling patterns. It is consistent with our finding of improved sarcomeric morphology and preserved *in vitro* beating of neonatal cardiomyocytes. All these characteristics of DN-Ras make Ras an interesting therapeutic target in pathological cardiac hypertrophy.

#### Sources of funding

This study was supported in part by NIH RO1 HL083156, HL080498, HL093183, and P20HL100396 (RJH); Association Française contre les Myopathies (AFM 16442; LL, RJH); NIH/NHLBI T32HL007824 (ERC); as well as the AHA-SDG (15SDG23250005) for (PSD).

None of the funding sources was involved in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication.

#### Disclosure

The authors have no conflict of interest to disclose.

#### Acknowledgments

The adenovirus with DN-Ras was a kind gift from Dr. Mladen Golubic (Center for Integrative Medicine, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio), while the oncogenic mutant of Ras-Val12 was a gift of Dr. Mario I Romero-Ortega (Regenerative Neurobiology Lab, The University of Texas, Arlington, TX). We thank Susan Kraner and Christopher M. Norris (Sanders-Brown Center on Aging, Lexington, KY-USA) for providing AdvVIT. Special thanks to Dr. Juan Ramón Fabregat for his support and advice.

#### References

- [1] S.C. Jeyaraj, N.T. Unger, M.A. Chotani, Rap1 GTPases: an emerging role in the cardiovascular system, *Life Sci.* 88 (2011) 645–652.
- [2] F. Lezoualc'h, M. Metrich, I. Hmitou, N. Duquesnes, E. Morel, Small GTP-binding proteins and their regulators in cardiac hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 44 (2008) 623–632.
- [3] K. Koera, K. Nakamura, K. Nakao, J. Miyoshi, K. Toyoshima, T. Hatta, H. Otani, A. Aiba, M. Katsuki, K-ras is essential for the development of the mouse embryo, *Oncogene* 15 (1997) 1151–1159.
- [4] L.M. Esteban, C. Vicario-Abejon, P. Fernandez-Salguero, A. Fernandez-Medarde, N. Swaminathan, K. Yienger, E. Lopez, M. Malumbres, R. McKay, J.M. Ward, A. Pellicer, E. Santos, Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 1444–1452.
- [5] A. Clerk, P.H. Sugden, Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy, *Circ. Res.* 86 (2000) 1019–1023.
- [6] A.L. Schulz, B. Albrecht, C. Arici, I. van der Burgt, A. Buske, G. Gillissen-Kaesbach, R. Heller, D. Horn, C.A. Hubner, G.C. Korenke, R. Konig, W. Kress, G. Kruger, P. Meinecke, J. Mucke, B. Plecko, E. Rossier, A. Schinzel, A. Schulze, E. Seemanova, H. Seidel, S. Spranger, B. Tuysuz, S. Uhrig, D. Wiczorek, K. Kutsche, M. Zenker, Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome, *Clin. Genet.* 73 (2008) 62–70.
- [7] K.R. Gottshall, J.J. Hunter, N. Tanaka, N. Dalton, K.D. Becker, J. Ross Jr., K.R. Chien, Ras-dependent pathways induce obstructive hypertrophy in echo-selected transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 4710–4715.
- [8] B.R. Wei, P.L. Martin, S.B. Hoover, E. Spehalski, M. Kumar, M.J. Hoenerhoff, J. Rozenberg, C. Vinson, R.M. Simpson, Capacity for resolution of Ras-MAPK-initiated early pathogenic myocardial hypertrophy modeled in mice, *Community Med.* 61 (2011) 109–118.

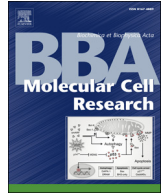
- [9] P.D. Ho, D.K. Zechner, H. He, W.H. Dillmann, C.C. Glembotski, P.M. McDonough, The Raf-MEK-ERK cascade represents a common pathway for alteration of intracellular calcium by Ras and protein kinase C in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21730–21735.
- [10] A. Thorburn, J. Thorburn, S.Y. Chen, S. Powers, H.E. Shubeita, J.R. Feramisco, K.R. Chien, HRas-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 2244–2249.
- [11] S.J. Fuller, J. Gillespie-Brown, P.H. Sugden, Oncogenic src, raf, and ras stimulate a hypertrophic pattern of gene expression and increase cell size in neonatal rat ventricular myocytes, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 18146–18152.
- [12] J.B. Pracyk, D.D. Hegland, K. Tanaka, Effect of a dominant negative ras on myocardial hypertrophy by using adenoviral-mediated gene transfer, *Surgery* 122 (1997) 404–410 (discussion 410–401).
- [13] R.S. Nagalingam, N.R. Sundaresan, M.P. Gupta, D.L. Geenen, R.J. Solaro, M. Gupta, A cardiac-enriched microRNA, miR-378, blocks cardiac hypertrophy by targeting Ras signaling, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 11216–11232.
- [14] G.X. Zhang, S. Kimura, K. Murao, X. Yu, K. Obata, H. Matsuyoshi, M. Takaki, Effects of angiotensin type I receptor blockade on the cardiac Raf/MEK/ERK cascade activated via adrenergic receptors, *J. Pharmacol. Sci.* 113 (2010) 224–233.
- [15] N. Duquesnes, F. Vincent, E. Morel, F. Lezoualc'h, B. Crozatier, The EGF receptor activates ERK but not JNK Ras-dependently in basal conditions but ERK and JNK activation pathways are predominantly Ras-independent during cardiomyocyte stretch, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1173–1181.
- [16] I.S. Harris, S. Zhang, I. Treskov, A. Kovacs, C. Weinheimer, A.J. Muslin, Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload, *Circulation* 110 (2004) 718–723.
- [17] J.J. Hunter, N. Tanaka, H.A. Rockman, J. Ross Jr., K.R. Chien, Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23173–23178.
- [18] L.A. Feig, G.M. Cooper, Inhibition of NIH 3T3 cell proliferation by a mutant ras protein with preferential affinity for GDP, *Mol. Cell. Biol.* 8 (1988) 3235–3243.
- [19] F. del Monte, S.E. Harding, U. Schmidt, T. Matsui, Z.B. Kang, G.W. Dec, J.K. Gwathmey, A. Rosenzweig, R.J. Hajjar, Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a, *Circulation* 100 (1999) 2308–2311.
- [20] E. Merlet, L. Lipskaia, A. Marchand, L. Hadri, N. Mougnot, F. Atassi, L. Liang, S.N. Hatem, R.J. Hajjar, A.M. Lompre, A calcium-sensitive promoter construct for gene therapy, *Gene Ther.* 20 (2013) 248–254.
- [21] J. Aramburu, F. Garcia-Cozar, A. Raghavan, H. Okamura, A. Rao, P.G. Hogan, Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT, *Mol. Cell* 1 (1998) 627–637.
- [22] J. Aramburu, M.B. Yaffe, C. Lopez-Rodriguez, L.C. Cantley, P.G. Hogan, A. Rao, Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A, *Science* 285 (1999) 2129–2133.
- [23] D. Lebeche, Z.B. Kang, R. Hajjar, Candesartan abrogates G protein-coupled receptors agonist-induced MAPK activation and cardiac myocyte hypertrophy, *J. Renin-Angiotensin-Aldosterone* 2001 (2001) S154–S161.
- [24] S.H. Sheikh Abdul Kadir, M. Miragoli, S. Abu-Hayyeh, A.V. Moshkov, Q. Xie, V. Keitel, V.O. Nikolaev, C. Williamson, J. Gorelik, Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes, *PLoS One* 5 (2010) e9689.
- [25] R.J. Hajjar, U. Schmidt, T. Matsui, J.L. Guerrero, K.H. Lee, J.K. Gwathmey, G.W. Dec, M.J. Semigran, A. Rosenzweig, Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 5251–5256.
- [26] F. del Monte, R.J. Hajjar, Efficient viral gene transfer to rodent hearts in vivo, *Methods Mol. Biol.* 219 (2003) 179–193.
- [27] G. Choukroun, R. Hajjar, S. Fry, F. del Monte, S. Haq, J.L. Guerrero, M. Picard, A. Rosenzweig, T. Force, Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by the stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal kinases, *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 391–398.
- [28] R.M. Lang, M. Bierig, R.B. Devereux, F.A. Flachskampf, E. Foster, P.A. Pellikka, M.H. Picard, M.J. Roman, J. Seward, J.S. Shanewise, S.D. Solomon, K.T. Spencer, M.S. Sutton, W.J. Stewart, Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology, *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 18 (2005) 1440–1463.
- [29] M. Kim, J.K. Oh, S. Sakata, I. Liang, W. Park, R.J. Hajjar, D. Lebeche, Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45 (2008) 270–280.
- [30] S. Kang, E.R. Chemaly, R.J. Hajjar, D. Lebeche, Resistin promotes cardiac hypertrophy via the AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) and c-Jun N-terminal kinase/insulin receptor substrate 1 (JNK/IRS1) pathways, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 18465–18473.
- [31] I. Kehat, J.D. Molkentin, Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation, *Circulation* 122 (2010) 2727–2735.
- [32] M. Ichida, T. Finkel, Ras regulates NFAT3 activity in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 3524–3530.
- [33] J. Sadoshima, Z. Qiu, J.P. Morgan, S. Izumo, Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling, *Circ. Res.* 76 (1995) 1–15.
- [34] N. Koitabashi, T. Aiba, G.G. Hesketh, J. Rowell, M. Zhang, E. Takimoto, G.F. Tomaselli, D.A. Kass, Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation. Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48 (2010) 713–724.
- [35] G.4th. Cooper, Cytoskeletal networks and the regulation of cardiac contractility: microtubules, hypertrophy, and cardiac dysfunction, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 291 (2006) H1003–H1014.
- [36] B. Sjoblom, A. Salmazo, K. Djinnovic-Carugo, Alpha-actinin structure and regulation, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 2688–2701.
- [37] F. Chang, L.S. Steelman, J.T. Lee, J.G. Shelton, P.M. Navolanic, W.L. Blalock, R.A. Franklin, J.A. McCubrey, Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention, *Leukemia* 17 (2003) 1263–1293.
- [38] J.D. Molkentin, Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling, *Circ. Res.* 87 (2000) 731–738.
- [39] J.D. Molkentin, Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs, *Cardiovasc. Res.* 63 (2004) 467–475.
- [40] Y. Zou, I. Komuro, T. Yamazaki, R. Aikawa, S. Kudoh, I. Shiojima, Y. Hiroi, T. Mizuno, Y. Yazaki, Protein kinase C, but not tyrosine kinases or Ras, plays a critical role in angiotensin II-induced activation of Raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protein kinases in cardiac myocytes, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 33592–33597.
- [41] V.J. LaMorte, J. Thorburn, D. Absher, A. Spiegel, J.H. Brown, K.R. Chien, J.R. Feramisco, K.U. Knowlton, Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 13490–13496.
- [42] B. Lei, D.A. Schwinn, D.P. Morris, Stimulation of alpha1a adrenergic receptors induces cellular proliferation or antiproliferative hypertrophy dependent solely on agonist concentration, *PLoS One* 8 (2013) e72430.
- [43] H. Jin, E.R. Chemaly, A. Lee, C. Kho, L. Hadri, R.J. Hajjar, F.G. Akar, Mechano-electrical remodeling and arrhythmias during progression of hypertrophy, *FASEB J.* 24 (2010) 451–463.
- [44] A.M. Lompre, L. Hadri, E. Merlet, Z. Keuylian, N. Mougnot, I. Karakikes, J. Chen, F. Atassi, A. Marchand, R. Blaise, I. Limon, S.W. McPhee, R.J. Samulski, R.J. Hajjar, L. Lipskaia, Efficient transduction of vascular smooth muscle cells with a translational AAV2.5 vector: a new perspective for in-stent restenosis gene therapy, *Gene Ther.* 20 (2013) 901–912.
- [45] D.E. Jaalouk, J. Lammerding, Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews, Mol. Cell Biol.* 10 (2009) 63–73.





Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbamcr](http://www.elsevier.com/locate/bbamcr)

## Corrigendum

## Corrigendum to “Dominant negative Ras attenuates pathological ventricular remodeling in pressure overload cardiac hypertrophy” [Biochim. Biophys. Acta 1853/11 (2015) 2870–2884]

Manuel Ramos-Kuri<sup>a,c,d,e,f,\*</sup>, Kleopatra Rapti<sup>a,1</sup>, Hind Mehel<sup>i,j,1</sup>, Shihong Zhang<sup>a</sup>, Perundurai S. Dhandapany<sup>b</sup>, Lifan Liang<sup>a,d,2</sup>, Alejandro García-Carrancá<sup>f</sup>, Regis Bobe<sup>h</sup>, Rodolphe Fischmeister<sup>i,j</sup>, Serge Adnot<sup>g</sup>, Djamel Lebeche<sup>a,d,2</sup>, Roger J. Hajjar<sup>a,d,2</sup>, Larissa Lipskaia<sup>a,g,3</sup>, Elie R. Chemaly<sup>a,d,3</sup>

<sup>a</sup> Cardiovascular Research Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, United States

<sup>b</sup> Department of Pediatrics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, One Gustave L. Levy Place, NY, United States

<sup>c</sup> Centro de Investigación Social Avanzada, Querétaro, Mexico

<sup>d</sup> Cardiovascular Research Center, Massachusetts General Hospital, Charlestown, MA, United States

<sup>e</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Universidad Panamericana, Mexico

<sup>f</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

<sup>g</sup> INSERM U955 and Département de Physiologie, Hôpital Henri Mondor, AP-HP, 94010, Créteil, Université Paris-Est Créteil (UPEC), France

<sup>h</sup> INSERM U770, Université Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>i</sup> INSERM UMR-S 1180, LabEx LERMIT DHU TORINO, Châtenay-Malabry, France

<sup>j</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

The authors would like to add the following legend in the acknowledgments section of the manuscript:

Manuel Ramos-Kuri is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship No. 87843 from CONACYT.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.006>.

\* Corresponding author at: Centro de Investigación Social Avanzada, Avenida Fray Luis de León No. 1000, CP 76190, Querétaro, Mexico.

E-mail addresses: [manuel.ramos@cisav.org](mailto:manuel.ramos@cisav.org), [mramosk@yahoo.com.mx](mailto:mramosk@yahoo.com.mx) (M. Ramos-Kuri).

<sup>1</sup> HM and KR contributed equally to this work.

<sup>2</sup> Present address for DL, LL, and RJH.

<sup>3</sup> LL and ERC contributed equally to this work.